

明 細 書

テトラヒドロ葉酸合成酵素遺伝子

5 <技術分野>

本発明は、テトラヒドロ葉酸合成酵素遺伝子、該遺伝子に係るDNA、該DNAがコードする蛋白質に関する。また、該DNAを含有するDNA、該DNAの相補鎖、該遺伝子に係るDNAの部分塩基配列で表されるDNAおよび該DNAの相補鎖のうちすくなくともいずれか1つにハイブリダイズするDNAに関する。

- 10 さらに、該遺伝子に係るDNAを含有する組換えベクター、該ベクターを含有する形質転換体、該形質転換体を用いた該蛋白質の製造方法、該蛋白質に対する抗体に関する。また、該蛋白質が有する細胞増殖促進活性を阻害する化合物の同定方法に関する。さらに、ある組織が大腸癌由来組織であるか否かを判定する方法に関する。また、該蛋白質の阻害剤を含んでなる癌の防止剤および／または治療
- 15 剤に関する。さらに、該遺伝子に係るDNAを含有するDNA、該DNAの相補鎖、該遺伝子に係るDNAの部分塩基配列で表されるDNAおよび該DNAの相補鎖のうちすくなくともいずれか1つにハイブリダイズするDNAおよび／または該抗体を含有する大腸癌の判定キットに関する。

20 <背景技術>

テトラヒドロ葉酸合成酵素（以後、C1-THFSという）は、様々な代謝反応に必要なC1基を供与するテトラヒドロ葉酸誘導体を合成する酵素である（非特許文献1、以後、テトラヒドロ葉酸をTFとテトラヒドロ葉酸誘導体をTF誘導体という）。具体的にはTF誘導体は、プリン、チミジル酸、ヒスチジンおよび

25 パントテン酸等の生合成反応にC1基を供与する。すなわちTFおよびTF誘導体は、核酸代謝およびアミノ酸代謝等に深く関与している。そのためTFおよびTF誘導体は、細胞分裂が盛んな組織に多くみられ、細胞増殖および成長に不可欠である。

C1-THFSは、3種の機能を有するトリ酵素である。具体的には、C1-THFSは、10-ホルミルテトラヒドロ葉酸合成酵素 (10-formyl-THF synthetase、EC 6.3.4.3)、5,10-メテニルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼ (5,10-methenyl-THF cyclohydrolase、EC 3.5.4.9) および5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ (5,10-methylene-THF dehydrogenase、EC 1.5.1.5) の機能を有する。C1-THFSは、これらの機能を発揮することにより、様々な代謝反応に必要なTF誘導体の合成を促進する。

- 10 C1-THFSは、ヒト、マウス、酵母等の真核生物、大腸菌等の原核生物など様々な生物種を対象に、その解析が進められている (非特許文献2—5)。酵母については、その細胞質およびミトコンドリアに存在し機能するC1-THFSの存在が知られている。また、ヒトについては、その細胞の細胞質に存在し機能するC1-THFSが知られている。
- 15 しかし、ヒトについてその細胞のミトコンドリアに存在し機能するC1-THFSは知られておらず、唯一、非特許文献19の報告があるのみである。また大腸癌組織において正常大腸組織と比較し発現が亢進するヒトC1-THFS遺伝子も知られていない。

- 20 以下に、本明細書で引用した文献を列記する。

非特許文献1

- ハム (Hum DW) ら、「ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリ (The Journal of Biological Chemistry)」、1988年、第263巻、第31号、p. 15946—15950。

非特許文献2

- スタベン (Staben, C) ら、「ザ ジャーナル オブ バイオロジカル

ケミストリ (The Journal of Biological Chemistry)」、1984年、第261巻、p. 4629-4637。

非特許文献3

- 5 シャノン (Shannon, K. W.) ら、「ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリ (The Journal of Biological Chemistry)」、1986年、第261巻、p. 12266-12271。

非特許文献4

- 10 シグペン (Thigpen, A. E.) ら、「ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリ (The Journal of Biological Chemistry)」、1990年、第265巻、p. 7907-7913。

非特許文献5

- 15 デブ (Dev, I. K.) ら、「ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリ (The Journal of Biological Chemistry)」、1978年、第253巻、p. 4245-4253。

非特許文献6

- 20 ラジら (Raj SKら)「バイオケミストリ アンド モレキュラ バイオロジ インターナショナル (Biochemistry and molecular biology international)」、第44巻、第1号、p. 89-95。

25 非特許文献7

フローマンら (Frohman M. A. et al.)「プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイテッド ステーツ オブ アメリカ (Proceedings of The

National Academy of Sciences of The United States of America)」、1988年、第85巻、第23号、p. 8998-9002。

5 非特許文献8

「プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエ
ンシズ オブ ザ ユナイテッド ステーツ オブ アメリカ (Proceed
ings of The National Academy of Sciences of The United States of Americ
a)」、1977年、第74巻、p. 5463-5467。

非特許文献9

「メソッズ イン エンザイモロジー (Methods in Enzym
ology)」、1980年、第65、p. 499-。

15 非特許文献10

クラロス (Claros MG) ら、ヨーロッパアン ジャーナル オブ バイ
オケミストリ (European Journal of Biochemis
try)、1996年、第241巻、第3号、p. 779-786。

20 非特許文献11

キム (Kim PJ) ら、「ランセット (Lancet)」
2003年、第362巻、p. 205-209。

25 非特許文献12

ギルズ (R.H. Giles) ら、「バイオシミカ イト バイオフィジカ アクタ
(Biochimica et Biophysica Acta)」、2003
年、第1653巻、p. 1-24。

非特許文献 13

ヘイ (He TC) ら、「サイエンス (Science)」、1998年、
第128巻、p. 1509-1515。

5

非特許文献 14

レベンス (Levens DL)、「ジーンズ アンド デベロップメント
(Genes and Development)」, 2003年、第17号、p.
1071-1077。

10

非特許文献 15

ガロウ (Garrow TA) ら、「ザ ジャーナル オブ バイオロジカル
ケミストリ (The Journal of Biological Chem
istry)」, 1993年、第268巻、p. 11910-11916。

15

非特許文献 16

ニキフォロフ (Nikiforov MA) ら、「モレキュラー アンド セ
ルラー バイオロジー (Molecular and Cellular B
iology)」, 2002年、第22巻、p. 5793-5800。

20

非特許文献 17

タブチジアン (Tavtigian SV) ら、「モレキュラー バイオロ
ジー オブ ザ セル (Molecular Biologya of the
Cell)」, 1994年、第5巻、p. 375-388。

25

非特許文献 18

ビラー (Villar E) 「ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミス
トリ (The Journal of Biological Chemist

ry)」、1985年、第260巻、第4号、p. 2245-2252

非特許文献19

- 5 プラサンナン (Prasannan P) ら、「ザ ジャーナル オブ バイ
オロジカル ケミストリ (The Journal of Biological
Chemistry)」、2003年、第278巻、第44号、p. 4317
8-43187。

非特許文献20

- 10 杉浦ら、「バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュ
ニケーションズ (Biochem Biophys Res Commun.)
2004年、第315巻、第1号、p. 204-211)

<発明の開示>

- 15 本発明が解決しようとする課題は、新規C1-THFS遺伝子に係るDNAお
よび該DNAがコードする蛋白質を見出して提供することである。さらに、該遺
伝子に係るDNAを含有するDNA、該DNAの相補鎖、該遺伝子に係るDNA
の部分塩基配列で表されるDNAおよび該DNAの相補鎖のうちすくなくともい
20 づれか1つにハイブリダイズするDNAを提供することも課題に含まれる。また、
該遺伝子に係るDNAを含有する組換えベクター、該組換えベクターを用いて形
質転換させてなる形質転換体、該蛋白質に対する抗体、該蛋白質の製造方法およ
び該蛋白質の細胞増殖促進活性を阻害する化合物の同定方法を提供することも課
25 題に含まれる。さらに、該遺伝子に係るDNAを含有するDNA、該DNAの相
補鎖、該遺伝子に係るDNAの部分塩基配列で表されるDNAおよび該DNAの
相補鎖のうちすくなくともいづれか1つにハイブリダイズするDNAおよび／ま
たは該抗体を含有する大腸癌の判定キットおよびある組織が大腸癌由来組織であ
るか否かを判定する方法を提供することも課題に含まれる。また、大腸癌の防止
剤および／または治療剤を提供することも課題に含まれる。

本発明者らは上記課題のために鋭意努力し、新規C 1－T H F S 遺伝子を見出し、該遺伝子に係るDNAを用いて新規C 1－T H F S を取得することに成功した。そして、該DNAの塩基配列を解析することにより、該C 1－T H F S が、細胞質からミトコンドリアに移行し、ミトコンドリアにおいて機能することを見出した。また、該C 1－T H F S が細胞増殖促進活性を有することを実証した。さらに、該C 1－T H F S 遺伝子の発現が、大腸癌組織において正常大腸組織と比較し有意に亢進することを実証して、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、以下の態様を含む。

(1) 以下の (a)、(b) のいずれかのDNA：

10 (a) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列の94番目から2934番目の塩基配列で表されるDNA、

(b) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列で表されるDNA。

(2) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列の94番目から2934番目の塩基配列を含み、かつ、10－ホルミルテトラヒドロ葉酸合成酵素活性、5，1
15 0－メテニルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼ活性および5，10－メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ活性の3つの活性、および／または、細胞増殖促進活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(3) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列で表されるDNAである、(2)に記載のDNA。

20 (4) (1) から (3) のいずれかに記載のDNAのDNA配列において1ないし複数のDNAの欠失、置換、付加された塩基配列を有し、かつ細胞増殖促進活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(5) (1) から (4) のいずれか1項に記載のDNAを含有するDNA、該DNAの相補鎖、(1) から (4) のいずれか1項に記載のDNAの部分塩基配
25 列で表されるDNAおよび該DNAの相補鎖のうちすくなくともいずれか1つにストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA。

(6) 以下の群より選ばれるDNAであって、(1) から (4) のいずれか1項に記載のDNAを含有するDNA、該DNAの相補鎖、(1) から (4) のい

いずれか1項に記載のDNAの部分塩基配列で表されるDNAおよび該DNAの相補鎖のうちすくなくともいずれか1つを増幅するためのプライマーおよび／または検出するためのプローブである(5)に記載のDNA；

(i) 配列表の配列番号3に記載の塩基配列で表されるDNA、

5 (ii) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列で表されるDNA、

(iii) 配列表の配列番号5に記載の塩基配列で表されるDNA

および

(iv) 配列表の配列番号6に記載の塩基配列で表されるDNA。

10 (7) (1) から (4) のいずれか1項に記載のDNAを含有する組換えベクター。

(8) プラスミド FERM BP-8419号。

(9) (7) に記載の組換えベクターまたは(8)に記載のプラスミドにより形質転換された形質転換体。

(10) 以下の(a)から(b)のいずれかの蛋白質。

15 (a)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列の32番目から978番目のアミノ酸配列で表される蛋白質。

(b)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質。

(11) (4) に記載のDNAがコードする蛋白質。

20 (12) (7) に記載の組換えベクターまたは(8)に記載のプラスミドにより形質転換された形質転換体を培養する工程を含む、(10)または(11)に記載の蛋白質の製造方法。

(13) (10) または(11) に記載の蛋白質または該蛋白質の断片を抗原とする抗体。

25 (14) (10) または(11) に記載の蛋白質が有する細胞増殖促進活性を阻害する化合物の同定方法であって、ある化合物と(10)または(11)に記載の蛋白質との相互作用を可能にする条件下で、細胞増殖促進活性の存在、非存在または変化を検出することにより、該化合物が(10)または(11)に記載の蛋白質の細胞増殖促進活性を阻害するか否かを判定することを特徴とする

同定方法。

(15) (10) または (11) に記載の蛋白質が有する細胞増殖促進活性を阻害する化合物の同定方法であって、(10) または (11) に記載の蛋白質、

(1) から (4) のいずれか 1 項に記載の DNA、(5) または (6) に記載の DNA、(7) に記載の組換えベクターまたは (8) に記載のプラスミド、(9) に記載の形質転換体および (13) に記載の抗体のうちすくなくともいずれか 1 つを用いることを特徴とする同定方法。

(16) ある組織が大腸癌由来組織であるか否かを判定する方法であって、ある組織における (1) から (4) のいずれか 1 項に記載の DNA の発現量を測定することを特徴とする判定方法。

(17) (16) に記載の判定方法であって、ある組織における (1) から (4) のいずれか 1 項に記載の DNA の発現量が、対照である正常大腸由来組織における (1) から (4) のいずれか 1 項に記載の DNA の発現量の 3 倍以上である場合に、ある組織が大腸癌由来組織であると判定することを特徴とする判定方法。

(18) (17) に記載の判定方法であって、ある組織における (1) から (4) のいずれか 1 項に記載の DNA の発現量を以下の工程により測定することを特徴とする判定方法；

(i) ある組織に含まれる RNA を鋳型に、逆転写反応を行う工程、

(ii) 逆転写反応により合成された cDNA を鋳型に、配列表の配列番号 5 および 6 に記載の塩基配列で表される DNA をプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応を行う工程および

(iii) ポリメラーゼ連鎖反応により増幅された DNA の量を測定する工程。

(19) (5) または (6) に記載の DNA および (13) に記載の抗体のうちすくなくともいずれか 1 つを含有することを特徴とする大腸癌の判定キットであって、(16) から (18) のいずれか 1 項に記載の判定方法に用いることを特徴とする大腸癌の判定キット。

(20) (10) または (11) に記載の蛋白質の阻害剤を含んでなる大

腸癌の防止剤および／または治療剤。

<図面の簡単な説明>

図1は、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子のcDNAおよび該遺伝子がコードする蛋白質の一次構造を示す図である。上段にcDNA、下段に蛋白質の一次構造を示す。

NDはN末端部分DNAを、NTは、N末端欠損DNAを、SPはターゲット配列（シグナルペプチド）を示す。

図2は、ヒトC1-THFS (Human C-1 tetrahydrofolate synthetase) および本発明で提供されるDNAに係る遺伝子 (DKFZP) の一次構造を示す。D/C ドメインは、5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼおよび5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼの酵素活性に対応する部分構造を意味する。S ドメインは、10-ホルミルテトラヒドロ葉酸合成酵素の酵素活性に対応する部分構造を意味する。

図3は、pCMV-Tag4A-hC1Sの構造を示す図である。図中、BamHI 687およびXhoI 3630は、制限酵素BamHIおよびXhoIの認識部位を示す。CMVプロモーターは、サイトメガロウイルスプロモーター領域、Neo^r/Kan^rは、ネオマイシンおよびカナマイシン耐性遺伝子部位を示す。hC1Sは、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子の挿入部位を示す。

図4は、正常大腸細胞および大腸癌細胞内における本発明で提供されるDNAに係る遺伝子の発現量を示す写真である。上段に本発明で提供されるDNAに係る遺伝子の発現量、下段に対照であるグリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素遺伝子の発現量を示す。

1は大腸癌細胞HCT116、2は大腸癌細胞SW620、3は正常大腸細胞CCD841CONを表す。DKFZPは、本発明で提供される遺伝子の発現量を、GAPDHは、グリセリンアルデヒド三リン酸脱水素酵素の発現量を示す。

図5は、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子がコードする蛋白質の発現を確認したウエスタンブロッティングの結果の写真である。図中、lysateは293細胞の溶解溶液のサンプルであること、IPPは293細胞の溶解溶液中で抗FLAG抗体により免疫沈降させた後の沈降物のサンプルであることを示す。

5 一は、遺伝子導入されない動物細胞由来のサンプル、Eは、pCMV-Tag 4 Vectorが導入された動物細胞由来のサンプル、FLは、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子組換えpCMV-Tag 4 Vectorが導入された動物細胞由来のサンプルを示す。

図6は、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子によりコードされる蛋白質
10 が、細胞増殖を促進することを示す写真である。24 well plate→10 cm plateレーンは、24穴のプレートに播種した293細胞に本発明で提供されるDNAに係る遺伝子を導入後10 cmプレートに播き直したサンプルを示す。12 well plate→10 cm plateレーンは、12穴のプレートに播種した293細胞に本発明で提供されるDNAに係る遺伝子を導
15 入後10 cmプレートに播き直したサンプルを示す。

DKFZ Pは、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子組換えpCMV-Tag 4 Vectorが導入された動物細胞の増殖を、Empty Vectorは、pCMV-Tag 4 Vectorが導入された動物細胞の増殖を示す。

図7は、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子がコードする蛋白質の細胞
20 内局在を示す写真である。図中、Mは、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子を導入した293細胞から単離したミトコンドリア画分、Cはその細胞質画分を示す。上段は抗FLAGによるイムノブロッティングの結果、下段は抗ミトコンドリアHSP 70抗体による結果を示す。

図8は、既存の抗癌剤標的遺伝子と本発明で提供されるDNAに係る遺伝子
25 の発現パターンを比較した図である。左図は本発明で提供されるDNAに係る遺伝子、中図はDHFR遺伝子、右図はTS遺伝子の発現パターンで、それぞれ左から正常大腸組織、大腸癌および胸腺での発現強度が示されている。各ドットは、各臓器サンプルでの強度を示し、バーはそれらの平均値を示す。

図 9 は、ミトコンドリア 1 炭素単位代謝系活性化のカスケード仮説を示す図である。β カテニンの活性化に始まり、段階を経て、ミトコンドリアの C 1 単位代謝の活性化が引き起こされることを示す。

5 <発明を実施するための最良の形態>

本願明細書において、「ストリンジェントな条件下」とは、例えば、6 × S S C、0.5 % S D S および 50 % ホルムアミドの溶液中で 42 °C にて加温した後、0.1 × S S C、0.5 % S D S の溶液中で 68 °C にて洗浄する場合を意味する。

10 ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリー・マニユアル (Molecular cloning, A Laboratory Manual, T. マニアティス (T. Maniatis) 他著、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、1989 年発行) 等に記載されている方法に準じて行った場合を意味する。

15 本願明細書において、「相同性」とは、例えば、B L A S T (National Center for Biotechnology Information) を用いて計算される数値を意味する。

本願明細書において、「組織」とは 1 以上の細胞を含んでいれば良く、単一の細胞も、「組織」の定義に含まれる。

(遺伝子の取得)

20 本遺伝子に係る DNA は、自体公知の DNA クローニング方法、R T - P C R 法 (非特許文献 6) および R A C E 法 (非特許文献 7) 等を利用して、取得される。例えば、R T - P C R 法を用いる場合には、まず本遺伝子に係る DNA の発現が確認されている適当な起源から全ての RNA を自体公知の RNA 調整法を利用して抽出する。本遺伝子は、ヒト大腸癌組織において正常大腸組織と比較し、
25 その発現が亢進していることより、該起源としてヒト大腸癌組織が例示される。次に、抽出された RNA から、自体公知の逆転写酵素反応を利用して c DNA を合成する。逆転写酵素反応用のプライマーとしては、オリゴ (d T) プライマー、ランダムプライマー等が例示できる。これらのプライマーは、常法に従って合成

により得ることができる。合成された cDNA を、cDNA の塩基配列に特有なプライマー（センスプライマーおよびアンチセンスプライマーの 2 種類のプライマー）を用いて、自体公知の PCR 法を利用して増幅する。PCR 用のプライマーは、cDNA の塩基配列情報に基づいて適宜設計でき、常法に従って合成により得ることができる。センスプライマーとしては、配列表の配列番号 3 に記載の DNA 配列からなる DNA を例示することができる。アンチセンスプライマーとしては、配列表の配列番号 4 に記載の DNA 配列からなる DNA を例示することができる。増幅した cDNA の単離精製は、常法により行うことができる。例えば、ゲル電気泳動法により実施可能である。増幅後、単離精製された cDNA として、本遺伝子に係る DNA を取得することができる。

取得された DNA の塩基配列は、公知の方法を利用して決定することができる。例えば、ジデオキシ法（非特許文献 8）、マクサム・ギルバート法（非特許文献 9）を用いて塩基配列を決定することができる。

15 (遺伝子の機能)

本遺伝子は、ORF 2934bp、978 アミノ酸をコードする新規の遺伝子であることが明らかとなった。このうち、1 番目から 31 番目のアミノ酸配列がミトコンドリアターゲット配列であり、32 番目から 978 番目のアミノ酸配列で表される蛋白質が成熟蛋白質である。

20 本遺伝子に係る DNA の 5' 末端部分の一部（以後、N 末端部分 DNA という）が欠落した DNA（以後、N 末端欠損 DNA という）の塩基配列は、ヌクレオチドデータベース（DDBJ/EMBL/GenBank）に登録され、公開されている（図 1）。N 末端欠損 DNA は、既知のヒト C1-THFS 遺伝子に係る DNA と、塩基配列上において高い相同性を有することが分かっている（図 2）。

25 N 末端欠損 DNA と既知のヒト C1-THFS 遺伝子に係る DNA とのアミノ酸配列上における相同性検索の結果、N 末端欠損 DNA は、既知のヒト C1-THFS が有する 3 種類の酵素活性に対応する既知ヒト C1-THFS 遺伝子上の部分配列のうち、10-ホルミルテトラヒドロ葉酸合成酵素の酵素活性に対応す

る部分配列に対し 75.7% 程度の相同性を有し、5, 10-メテニルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼの酵素活性に対応する部分配列に対し 33.2% 程度の相同性を有し、5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼの酵素活性に対応する部分配列に対し 33.2% 程度の相同性を有することが、明らかとなった。

また、ヒト C1-THFS オルソログが既に発見されている。ヒト C1-THFS オルソログ遺伝子と既知のヒト C1-THFS 遺伝子との塩基配列上における相同性検索の結果、ヒト C1-THFS オルソログ遺伝子は、既知ヒト C1-THFS が有する 3 種類の酵素活性に対応する部分配列のうち、5, 10-メテニルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼの酵素活性に対応する部分配列および 5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼの酵素活性に対応する部分配列への相同性と比較し、10-ホルミルテトラヒドロ葉酸合成酵素の酵素活性に対応する部分配列への相同性が高いことが分かっている。さらに、ヒト C1-THFS オルソログ遺伝子がコードする蛋白質は、既知のヒト C1-THFS が有する 3 種類の酵素活性すべてを有していることも、明らかとなっている。

すなわち、5, 10-メテニルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼの酵素活性に対応する部分構造および 5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼの酵素活性に対応する部分構造は、10-ホルミルテトラヒドロ葉酸合成酵素の酵素活性に対応する部分構造に比べ、DNA 変異等の原因によるアミノ酸配列の変化に対し、活性が失われにくい部分構造であると考えられている。

これらのことより、本遺伝子に係る DNA がコードする蛋白質も、C1-THFS が有する 3 種類の酵素活性すべてを有していると考えられる。すなわち本遺伝子に係る DNA がコードする蛋白質は、ヒト C1-THFS のアイソザイムであると考えられる。

一方、リボソームにおいて合成された蛋白質の中には、N 末端部分に特有のターゲット配列を有しているものがある。それら蛋白質は、ターゲット配列に応じてゴルジ体、ミトコンドリアなどの細胞小器官へ輸送されることがわかっている。ミトコンドリアへ輸送される全ての蛋白質が有するターゲット配列に、アミノ酸

配列上のコンセンサスがあるということではない。しかし、ミトコンドリアへ輸送される全ての蛋白質が有するターゲット配列は、共通して、塩基性アミノ酸の含有率が高く、ターゲット配列全体は疎水的であることがわかっている（非特許文献10）。そこで、本傾向を指標に、アミノ酸配列が明らかな任意の蛋白質がミ
5 トコンドリアへ輸送されるためのターゲット配列を有しているか否かを予測することは、可能である。

N末端DNAがコードするポリペプチドがターゲット配列を有するか否かを、そのアミノ酸配列から予測した結果、N末端DNAがコードするポリペプチドは、ターゲット配列を有していることが明らかとなった。よって、本遺伝子に係るD
10 NAがコードする蛋白質は、リボソームにおいて合成された後、ミトコンドリアへ輸送され、さらにミトコンドリアにおいてターゲット配列に係るペプチドが切断され、その結果、ターゲット配列に係るペプチドが除かれたポリペプチドが成熟蛋白質として機能すると考えられる。下記実施例で示すように、配列2のアミノ酸配列の1番目から31番目のアミノ酸配列がミトコンドリアターゲット配列
15 であることを確認している。

また、本遺伝子に係るDNAをヒト胎児腎臓由来の細胞株にリボソームを用いて導入した結果、導入しない場合と比較し、細胞増殖が促進された。本遺伝子に係るDNAがコードする蛋白質が、C1-THFSの3種類の酵素活性を有していると予想されることから、細胞増殖促進の結果は、本遺伝子に係るDNAがコ
20 ードする蛋白質が、核酸合成に関与していると考えられる。

本遺伝子に係るDNAは、N末端欠損DNAと比較し、N末端部分DNA、すなわち細胞質からミトコンドリアへの移行のためのターゲット配列に係るDNAを含むDNAを有している。このことは、本遺伝子が、既知の細胞質に存在し機能しているヒトC1-THFSをコードする遺伝子とは異なり、ミトコンドリア
25 局在性のヒトC1-THFSをコードする遺伝子であることを意味している。また、正常大腸組織と比較し大腸癌組織において、本遺伝子の発現が有意に亢進している。以上のことから、本発明はC1-THFSの代謝反応のさらなる解明に寄与するものである。また、本遺伝子は、従来のC1-THFS遺伝子にはない

抗癌剤が標的とする蛋白質をコードする遺伝子として、新たな抗癌剤の開発に寄与することができる。

(DNA)

5 本発明に係るDNAは、配列表の配列番号1に記載の塩基配列の94番目から2934番目の塩基配列を含むDNAであり、好ましくは、配列表の配列番号1に記載の塩基配列の94番目から2934番目の塩基配列で表されるDNA、また、配列表の配列番号1に記載の塩基配列で表されるDNAである。

10 また、本発明に係るDNAには、配列表の配列番号1の塩基配列の94番目から2934番目の塩基配列を含み、かつ、10-ホルミルテトラヒドロ葉酸合成酵素活性、5, 10-メチルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼ活性および5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ活性の3つの活性、および/または、細胞増殖促進活性を有する蛋白質をコードするDNAも含まれ、好ましくは、配列表の配列番号1に記載の塩基配列の94番目から2934番目
15 の塩基配列で表されるDNA、また、配列表の配列番号1に記載の塩基配列で表されるDNAである。

20 さらに、本発明に係るDNAには、上記DNAのDNA配列において1ないし複数のDNAの欠失、置換、付加などの変異あるいは誘発変異などを有し、かつ細胞増殖促進活性を有する蛋白質をコードするDNAも含まれる。該DNAは、天然に存在するものであってよく、また天然由来の遺伝子に基づいて変異を導入して得たDNAであってもよい。変異を導入する手段は自体公知であり、エキソヌクレアーゼを用いた欠失変異体の作製法、部位特異的突然変異誘発法などが挙げられる。

25 「1ないし複数」とは、一般には、1個から20個、好ましくは、1個から10個、さらに好ましくは、1個から数個である。数個とは、一般には1個から5個、好ましくは、1個から3個、さらに好ましくは、1個から2個である。

本明細書において、上記DNAを本遺伝子に係るDNAという。

また、本発明に係るDNAには、本遺伝子に係るDNAを含有するDNA、該

DNAの相補鎖、本遺伝子に係るDNAの部分塩基配列で表されるDNAおよび該DNAの相補鎖のうちすくなくともいずれか1つにストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAも含まれる。該DNAは、その最小単位として好ましくは5個以上のヌクレオチド、より好ましくは10個以上のヌクレオチド、さらに好ましくは20個以上のヌクレオチドからなるDNAである。該DNAは、本発明に係るDNAに固有な塩基配列領域を有することが好ましい。該DNAは、該DNAの塩基配列情報に基づいて、自体公知の化学合成方法（参照：ジーン（Gene）、第60(1)巻、第115-127頁(1987)）を利用して製造可能である。該DNAは、本遺伝子に係るDNAを増幅するためのプライマーまたは本遺伝子に係るDNAの検出用プローブなどに用いられる。

本遺伝子に係るDNAを含有するDNAとしては、本遺伝子に係るDNAのN末端および／またはC末端に付加配列を有するDNAが挙げられる。かかるDNAがコードする蛋白質が細胞増殖活性および／または前期3種の酵素活性を有する限りにおいて付加配列は限定されない。

また、本発明に係るDNAには、本遺伝子に係るDNAを含有するDNA、該DNAの相補鎖、本遺伝子に係るDNAの部分塩基配列で表されるDNAおよび該DNAの相補鎖のうちすくなくともいずれか1つを増幅するためのプライマーおよび／または検出するためのプローブであるDNAも含まれる。該DNAは、本遺伝子の取得、本遺伝子の転写物量の測定などに用いられる。例えば、該DNAは、配列表の配列番号3から6のいずれか1つに記載の塩基配列からなるDNAである。例えば、配列表の配列番号3および4に記載の塩基配列からなるDNAは、本遺伝子に係るDNAの取得の際、本遺伝子に係るDNAを含有するDNAおよび該DNAの相補鎖を増幅するためのプライマーとして用いられる。例えば、配列表の配列番号5および6に記載の塩基配列からなるDNAは、本遺伝子に係るDNAの断片および該断片DNAの相補鎖を増幅するためのプライマーならびに本遺伝子に係るDNAおよび該DNAの相補鎖を検出するためのプローブとして用いられる。

本明細書において、上記DNAのうち本遺伝子に係るDNAを除くDNAを本

遺伝子等にハイブリダイズするDNAという。

(蛋白質)

本発明の一つの態様は、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列の32番目
5 から978番目のアミノ酸配列で表される蛋白質、または、配列表の配列番号2
に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質である。さらに、本発明に係る蛋白質に
は、本遺伝子に係るDNAがコードする蛋白質、例えば、配列表の配列番号1に
記載の塩基配列で表されるDNAのDNA配列において1ないし複数のDNAの
欠失、置換、付加などの変異あるいは誘発変異を有するDNAがコードする蛋白
10 質であって、細胞増殖促進活性を有する蛋白質も含まれる。

これらの蛋白質は、その構成アミノ基もしくはカルボキシル基などを修飾する
など、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。例えば、N末端や
C末端に別の蛋白質等を、直接的にまたはリンカー蛋白質を介して間接的に遺伝
子工学的手法などを用いて付加することにより標識化した蛋白質も本発明に含ま
15 れる。付加される蛋白質等としては、例えばグルタチオン S-トランスフェラ
ーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどの酵素類、His
-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tagなどのタグペプチ
ド類、フルオレセインイソチオシアネート等の蛍光物質類等が例示できる。これ
ら蛋白質等の付加により、本発明に係る蛋白質の精製、検出を容易にすることが
20 可能となる。

本発明が提供する蛋白質は、該蛋白質をコードするDNAを遺伝子工学的手法
により発現させた細胞、無細胞系合成産物、化学合成産物、または生体生物由来
の生物学的試料から調製したものであってよく、これらからさらに精製されたも
のであってよい。

25 本発明が提供する蛋白質は、該蛋白質の活性を阻害する阻害剤のスクリーニ
ングに有用である。例えば、該蛋白質の活性として、細胞増殖促進活性が挙げられ
る。

本遺伝子を提供する本発明を完成させることにより、本遺伝子に係るDNAが

コードする蛋白質を、そのC1-THFS活性を保持したまま、発現させることができる。また、該蛋白質の精製、該蛋白質を標的とした薬剤スクリーニングを可能にすることができる。

- 一方、本遺伝子に係るDNAは、N末端欠損DNAと比較し、N末端部分DNAすなわち細胞質からミトコンドリアへの移行のためのターゲット配列に係るDNAおよび構造遺伝子に係るDNAの部分塩基配列で表されるDNAを有している。よって、仮にN末端欠損DNAを用いて動物細胞等において強制的に該DNAを発現させた場合、N末端欠損DNAは構造遺伝子にかかるDNAを全て含んでいないため、発現させた蛋白質がC1-THFS活性を示さないと考えられる。
- また、N末端欠損DNAはミトコンドリアへの移行のためのターゲット配列に係るDNAを有していないため、発現させた蛋白質が細胞質からミトコンドリアへ移行しそこでC1-THFS活性を呈することも考えにくい。

(組換えベクター)

- 本発明は一つの態様として、本遺伝子に係るDNAを含有する組換えベクターを提供する。組換えベクターは、本遺伝子に係るDNA等を適当なベクターDNAに挿入することによって得ることができる。

- ベクターDNAは、導入する細胞の種類等により適宜選択される。ベクターDNAは、天然に存在するものを抽出したもののほか、増殖に必要な部分以外のDNAの部分が一部欠落したものでもよい。例えば、プラスミド、バクテリアファージおよびウイルス由来のベクターが例示できる。プラスミドDNAとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドおよび酵母由来のプラスミドが例示される。バクテリアファージDNAとしては、 λ ファージなどが例示される。ウイルス由来のベクターDNAとしては、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、パポバウイルス、SV40およびバキュロウイルスなどが例示される。その他、トランスポゾン由来、挿入エレメント由来のベクターDNAなどが例示される。あるいは、これらを組合わせて作成されるベクターDNA(コスミドなど)が例示される。組換えベクターは、目的の遺伝子配列と複製

そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー、選択マーカー等を構成要素とし、これらを自体公知の方法に基づき組合わせて作製される。選択マーカーとしては、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子などが例示できる。

ベクターDNAに目的の遺伝子を組み込む方法は、自体公知の方法を適用できる。例えば、適当な制限酵素を選択、処理して目的の遺伝子を特定部位で切断し、次いで同様に処理したベクターとして用いるDNAと混合し、リガーゼによって再結合する方法が用いられる。あるいは、目的の遺伝子に適当なリンカーをライゲーションし、これを目的に適したベクターのマルチクローニングサイトへ挿入することによっても、所望のベクターが得られる。

後述の実施例に示す pCMV—Tag4A—hC1S (図3) では、ベクターDNAとして、pCMV—Tag4 (STRATAGEN社製) を用いた。pCMV—Tag4A—hC1Sは、平成15年6月25日に、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に受託番号FERM BP-8419号として寄託されている。プラスミド FERM BP-8419号も本発明に含まれる。

(形質転換体)

本発明は一つの態様において、本発明に係る組換えベクターを、宿主に導入して得られる形質転換体を提供する。ベクターDNAとして発現ベクターを使用すれば、本発明に係る蛋白質を提供することが可能である。該形質転換体には、本発明に係るDNA以外の所望の遺伝子を組み込んだベクターDNAの1つまたは2つ以上をさらに導入することもできる。宿主に導入するベクターDNAは、1種のベクターであってもよいし、2種以上のベクターDNAでもあってもよい。

宿主としては、原核生物および真核生物のいずれをも用いることができる。原核生物としては、大腸菌、枯草菌等が例示できる。真核生物としては酵母、昆虫細胞、あるいはサル腎由来細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、マウスL細

胞、ラットGH3細胞、ヒトFL細胞、293EBNA細胞などの動物細胞が例示できる。好ましくは動物細胞を用いる。より好ましくは、ヒト細胞を用いる。

形質転換は、自体公知の方法を利用して行うことができる。好ましくは、遺伝子の安定性を考慮し、宿主の染色体へのインテグレート法が挙げられるが、簡便には核外遺伝子を用いた自立複製系を利用する。本発明が提供するDNAの導入は、それ自体公知の方法を利用して行われる。例えば、リン酸カルシウム法、エレクトポレーション法、リポフェクション法が例示できるが、これらの方法に限定されない。導入効率および簡便性の観点から、好ましくはリポフェクション法が挙げられる。なお、後述の実施例では、pCMV-Tag4A-hC1Sを293細胞へリポフェクション法により導入し、形質転換させた結果得られた形質転換体を用いて、本発明に係る蛋白質を発現させた。293細胞は、アデノウイルス5型の癌遺伝子E1でトランスフォームされたヒト胎児腎細胞を意味する。

(蛋白質の製造方法)

本発明は一つの態様において、本発明に係る形質転換体を培養する工程を含む本発明に係る蛋白質の製造方法を提供する。本発明に係る蛋白質の発現は、無細胞蛋白質発現系を用いて行うことができる。その他、大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、動物細胞等の自体公知の宿主を利用した遺伝子組換え技術を用いて、本発明に係る蛋白質を発現させることができる。例えば、本発明に係る形質転換体を培養し、次いで培養で得られる培養物から目的とする蛋白質を回収することにより、本発明に係る蛋白質を製造することができる。本発明に係る形質転換体の培養は、各々の宿主に最適な自体公知の培養条件および培養方法を利用して行うことができる。培養は、形質転換体により発現される該蛋白質の細胞増殖促進活性を指標にして実施することができる。また、該蛋白質が有する前記3種類の酵素活性を指標に実施することもできる。これらの酵素活性は、自体公知の方法（非特許文献18）を用いて測定可能である。あるいは、宿主中または宿主外に産生された該蛋白質量を指標にしてもよい。発現させた蛋白質は、自体公知の精製方法を利用して、精製回収することができる。例えば、分子篩、イオン交換クロマ

トグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等の組み合わせにより、精製回収することができる。その他、硫酸、アルコール等の分画手段によっても精製回収することができる。好ましくは、本発明に係る蛋白質に対する抗体を作製し、本発明に係る蛋白質の該抗体への特異的な吸着性を利用し、精製回収することができる。

(抗体)

本発明は一つの態様において、本発明に係る蛋白質に対する抗体を提供する。抗体は、本発明に係る蛋白質またはその断片を抗原として用いて作製する。抗原は、該蛋白質またはその断片でもよく、少なくとも8個、好ましくは少なくとも10個、より好ましくは少なくとも12個、さらに好ましくは15個以上のアミノ酸で構成される。該蛋白質に特異的な抗体を作製するためには、該蛋白質および/またはその断片に固有なアミノ酸配列からなる領域を用いることが好ましい。この領域のアミノ酸配列は、必ずしも本発明に係る蛋白質またはその断片に係るアミノ酸配列と同一または相同である必要がなく、該蛋白質の立体構造上の外部への露出部位であればよく、露出部位のアミノ酸配列が一次構造上不連続であっても、露出部位について連続的なアミノ酸配列であればよい。抗体は、免疫学的に本発明が提供する蛋白質および/またはその断片を特異的に結合または認識する限り特に限定されない。この結合または認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応を利用して決定できる。

抗体は、自体公知の抗体作製方法を利用して、産生される。抗体を産生するためには、本発明が提供する蛋白質またはその断片を、アジュバンドの存在または非存在下で、単独または担体に結合して動物に投与し、動物に対して体液性応答および/または細胞性応答等の免疫誘導を行う。担体は、自身が宿主に対して有害作用を起こさず抗原性を増強せしめるものであれば特に限定されず、例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。免疫される動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、馬等が好適に用いられる。ポリクローナル抗体は、上記免疫手段を施された動物の血清から自体公知の抗体回収法を利用して取

得する。好ましい抗体回収法としては、免疫アフィニティクロマトグラフィー法が例示できる。

モノクローナル抗体を生産するためには、上記免疫手段を施された動物から抗体産生細胞（例えば脾臓またはリンパ節由来のリンパ球）を回収し、自体公知の永久増殖性細胞への形質転換手段を導入することによって行われる。例えば、抗体産生細胞と永久増殖性細胞とを自体公知の方法で融合させてハイブリドーマを作成してこれをクローン化し、本発明が提供する蛋白質および／またはその断片を特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマを選別し、該ハイブリドーマの培養液から抗体を回収する。

かくして得られたポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、直接本発明が提供する蛋白質の精製用抗体、標識マーカ等として用いることができる。また、該ポリクローナル抗体または該モノクローナル抗体は、直接本発明が提供する蛋白質と結合し、その活性を制御することができる。よって、本発明に係る蛋白質の活性が関与する疾病の治療または／および防止のために有用である。例えば、ヒト正常大腸組織と比較してヒト大腸癌組織において、本遺伝子に係るDNAはその発現が亢進しているため、該ポリクローナル抗体または該モノクローナル抗体は、大腸癌の治療または／および防止に有用である。さらには該ポリクローナル抗体または該モノクローナル抗体は、該蛋白質の標識マーカ等として大腸癌の診断手段を提供することもできる。

（化合物の同定方法）

本発明は一つの態様において、本発明に係る蛋白質が有する細胞増殖促進活性を阻害する化合物の同定方法を提供する。該化合物の同定方法は、本発明に係る蛋白質、本発明に係るDNA、本発明に係る組換えベクターまたは本発明に係るプラスミド、本発明に係る形質転換体および本発明に係る抗体のうち少なくともいずれか1つを用いて、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して実施可能である。本発明に係る同定方法により、該蛋白質の立体構造に基づくドッキングデザインによる拮抗剤の選別または該抗体を利用した抗体認識物質の選別

などが可能である。該同定方法により同定された化合物は、本発明に係る蛋白質の活性が関与する疾病の治療または／および防止のために有用である。ヒト正常大腸組織と比較してヒト大腸癌組織において本遺伝子に係るDNAはその発現が亢進している。よって、該化合物は大腸癌の治療または／および防止などに有用である。

例えば、本発明に係る蛋白質の細胞増殖促進活性を測定する実験系において、該蛋白質と被検化合物の相互作用を可能にする条件下で、該蛋白質と被検化合物とを共存させて該活性を測定する。ついで、被検化合物の非共存下での測定結果との比較における該活性の存在、非存在または変化、例えば低減、増加、消失、出現などを検出することにより、該蛋白質の該活性を阻害する化合物を同定可能である。活性の測定は、活性の直接的な検出により行うこともできるし、例えば活性の指標となるシグナルを実験系に導入して該シグナルを検出することにより実施可能である。シグナルとして、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tagなどのタグペプチド類等を用いることができる。

被検化合物を共存させた場合の該蛋白質の該活性を、被検化合物を共存させなかった場合の該蛋白質の該活性と比較することにより、該被検化合物が該活性に及ぼす効果を測定することができる。該被検化合物を共存させた場合の該活性が、該被検化合物を共存させなかった場合の該蛋白質の該活性と比較して低減した場合には、該被検化合物には該蛋白質の活性を阻害する作用があると判定できる。

一例として、本発明に係る蛋白質の細胞増殖促進活性を指標にして、該活性に影響を与え得る化合物を選別することができる。該細胞増殖促進活性は、本発明に係る蛋白質が発現する細胞を培養し、培養後に増殖した細胞数を計測することで定量化が可能である。細胞数は、バイオレッド、ニュートラルレッド等を用いて、生細胞を染色することにより計測され得る。また、生細胞による放射標識されたチミジンの取り込みを指標に、細胞数を計測することも可能である。

(大腸癌の判定方法)

また、本発明は一つの態様において、ある組織が大腸癌由来組織であるか否かを判定する方法であって、ある組織における本遺伝子に係るDNAの発現量を測定することを特徴とする判定方法を提供する。すなわち、本遺伝子に係るDNAは、大腸癌組織において正常大腸組織と比較し、有意にその発現が亢進している。よって、本遺伝子に係るDNAの発現量を指標に、ある組織が大腸癌由来組織であるか否かを判定することが可能である。

披検試料としては、本発明で提供される遺伝子および／またはその変異遺伝子の核酸および／または核酸断片を含むものである限り制限されない。例えば大腸組織細胞、大腸組織生検などの生体生物由来の生物学的試料を披検試料として例示できる。該核酸として、本遺伝子に係るDNAを含有するDNA、該DNAの相補鎖、本遺伝子に係るDNAの断片、該断片DNAの相補鎖およびこれらDNAが転写されてなるRNAなどが例示される。披検試料は、試料中に含まれる核酸の検出を容易ならしめる種々の方法、例えば変性、制限消化、電気泳動またはドットプロットングなどの方法を用いて調製され得る。

該核酸の検出および該核酸量の測定は、自体公知の遺伝子検出方法および測定方法を利用して行い得る。該検出方法として、例えばin situハイブリダイゼーション法、ノザンプロット法などが例示される。該測定方法として、ノザンプロット法、定量的RT-PCR法および分光分析法などが例示される。例えば、次の工程により本遺伝子に係るDNAの発現量を測定することが可能である。

(i) ある組織に含まれるRNAを鋳型に、逆転写反応を行う工程、(ii) 逆転写反応により合成されたcDNAを鋳型に、配列表の配列番号5および6に記載の塩基配列で表されるDNAをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応を行う工程

および(iii) ポリメラーゼ連鎖反応により増幅されたDNAの量を測定する工程。

該検出方法においては、本発明に係る遺伝子またはその変異遺伝子の同定および／または該遺伝子に係るDNAの増幅の実施に、本遺伝子に係るDNAまたは

- 該DNAの相補鎖の断片であってプローブとしての性質を有するものまたはプライマーとしての性質を有するものが有用である。プローブとしての性質を有するDNA断片とは、本遺伝子に係るDNAのみに特異的にハイブリダイゼーションできるDNAを意味する。プライマーとしての性質を有するものは、本遺伝子に係るDNAのみを特異的に増幅できるDNAを意味する。プローブまたはプライマーとしては、塩基配列長が一般的に5ないし50ヌクレオチド程度であるものが好ましく、10ないし35ヌクレオチド程度であるものがより好ましく、15ないし30ヌクレオチド程度であるものがさらに好ましい。一般的に、プローブは標識されたものを用いるが、非標識であってもよい。適当な標識としては、放射性同位体、ビオチン、蛍光物質、化学発光物質、酵素、抗体などが例示できる。プローブを標識する方法は、ニックトランスレーション、ランダムプライミングまたはキナーゼ処理を利用する方法などを例示することができる。例えば、該プローブおよび／またはプライマーとして、本発明に係るポリヌクレオチドが例示される。
- また、上記同定方法における発現量は、対照である正常大腸由来組織における本遺伝子に係るDNAの発現量と比較し、2倍以上、好ましくは3倍以上、より好ましくは4倍以上、さらに好ましくは8倍以上である場合に、ある組織が大腸癌由来組織であると判定することが可能である。後述の実施例において、大腸癌細胞における該DNAの発現量は正常大腸細胞における該DNAの発現量のおよそ2.38倍であった。

(大腸癌の判定キット)

- また、本発明は一つの態様において、本遺伝子等にハイブリダイズするDNAおよび本発明に係る抗体のうち少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする大腸癌の判定キットを提供する。例えば、ヒト大腸癌組織においてヒト正常大腸組織と比較して本遺伝子に係るDNAの発現の亢進が見られることから、被検組織における該DNAの発現産物を、本発明に係る大腸癌の判定キットに含有されるDNAをプローブとして用いることにより検出し、該DNAの発現量を測

定することにより、ある組織が大腸癌由来組織であるか否かを判定することが可能である。該判定キットには、緩衝液、塩、安定化剤および／または防腐剤などの物質を含んでいてもよい。なお、製剤化にあたっては、本遺伝子等にハイブリダイズするDNAおよび該抗体の性質に応じた自体公知の製剤化手段を導入すればよい。

(大腸癌の防止剤および／または治療剤)

本発明は一つの態様において、本発明に係る蛋白質の阻害剤を含んでなる大腸癌の防止剤および／または治療剤を提供する。本発明に係る蛋白質の阻害剤としては、本発明に係る抗体および本発明に係る化合物の同定方法により同定された化合物が例示される。大腸癌細胞において本遺伝子にかかるDNAの発現が正常大腸細胞と比較し亢進しているため、本発明に係る蛋白質の阻害剤は大腸癌の防止および／または治療に有用である。

医薬の製造には、1種または2種以上の医薬用担体を用いることが好ましい。本発明に係る医薬製剤中に含まれる有効成分の量は、広範囲から適宜選択されるが、通常約0.00001～70重量%、好ましくは0.0001～5重量%の範囲とするのが適当である。

医薬用担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤などの希釈剤や賦形剤などを例示でき、これらは得られる製剤の投与形態に応じて適宜選択される。

例えば、水、医薬に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアシルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトースなどが挙げられる。これらは、本発明に係る剤形に応じて適宜1種類または2種類以上を組合せて使用される。

所望により、通常の製剤に使用され得る各種の成分、例えば安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤などを適宜使用して調整することもできる。

安定化剤としては、例えばヒト血清アルブミンや通常のL-アミノ酸、糖類、
5 セルロース誘導体などを例示でき、これらは単独でまたは界面活性剤などと組合せて使用できる。特にこの組合せによれば、有効成分の安定性をより向上させ得る場合がある。上記L-アミノ酸は、特に限定はなく、例えばグリシン、システイン、グルタミン酸などのいずれでもよい。糖類も特に限定はなく、例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖などの単糖類、マンニトール、イノシ
10 トール、キシリトールなどの糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖などの二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスターチ、コンドロイチン酸、ヒアルロン酸などの多糖類などおよびそれらの誘導体などのいずれでもよい。セルロース誘導体も特に限定はなく、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシ
15 エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースなどのいずれでもよい。界面活性剤も特に限定はなく、イオン性および非イオン性界面活性剤のいずれでも使用できる。これには、例えばポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル系、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタンモノアシルエステル系、脂肪酸グリセリド系などが包含される。

20 緩衝剤としては、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、 ϵ -アミノカプロン酸、グルタミン酸および／またはそれらに対応する塩（例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩）などを例示できる。

等張化剤としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリン
25 などを例示できる。

キレート剤としては、例えばエドト酸ナトリウム、クエン酸などを例示できる。

本発明に係る医薬および医薬組成物は、溶液製剤として使用できる他に、これを凍結乾燥化し得る状態にした後、用時、水や生理的食塩水などを含む緩衝液な

どで溶解して適当な濃度に調整した後に使用することも可能である。

医薬組成物の用量範囲は特に限定されず、本発明の医薬組成物の有効性、投与形態、疾病の種類、対象の性質（体重、年齢、病状および他の医薬の使用有無等）および担当医師の判断により適宜選択することが望ましい。

- 5 一般的には適当な用量は、例えば対象の体重 1 k g あたり約 0. 0 1 μ g 乃至 1 0 0 m g 程度、好ましくは 0. 1 μ g から 1 m g 程度の範囲であることが好ましい。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いて、これらの用量の変更を行うことができる。上記投与量は、1 日 1 ～数回に分けて投与することができ、数日または数週間に 1 回の割合で間欠的に投与しても良い。

処方投与形態は適したものを選択すればよく、該処方投与形態は当業者によく知られたものを用いればよい。また、処方するときには、これらを単独で使用してもよく、あるいは治療に必要な他の化合物または医薬と共に使用してもよい。例えば、他の抗腫瘍用医薬の有効成分等を配合してもよい。

- 15 投与形態は、全身投与または局所投与のいずれも選択することができる。この場合、疾患、症状等に応じた適当な投与形態を選択する。例えば、通常の静脈内投与、動脈内投与のほか、皮下、皮内、筋肉内等に投与することもできる。大腸癌組織に直接投与することもできる。

- 20 医薬形状は投与形態に応じて選択することができ、遺伝子治療剤、シクロデキストリン等の包接体、溶液剤、けん濁剤、脂肪乳剤、散剤、軟膏剤、クリーム剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤丸剤、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、座剤、吸入剤、点眼剤、点耳剤等の作製も可能である。しかし、本発明の医薬の形態は、これに限定されない。

- 25 製剤化にあたっては、その形態に応じて適切な製剤用添加物を用いることができ、常法に従って製剤化することができる。

リポソーム化は、例えばリン脂質を有機溶媒（クロロホルム等）に溶解した溶液に、目的とする物質を溶媒に溶解した溶液を加えた後、溶媒を留去し、これにリン酸緩衝液を加え、振とう、超音波処理および遠心処理した後、上清をろ過処

理して回収することにより行い得る。

シクロデキストリン包接化は、例えば目的とする物質を溶媒に溶解した溶液に、シクロデキストリンを水等に加温溶解した溶液を加えた後、冷却して析出した沈殿をろ過し、滅菌乾燥することにより行い得る。このとき、使用されるシクロデキストリンは、当該物質の大きさに応じて、空隙直径の異なるシクロデキストリン（ α 、 β 、 γ 型）を適宜選択すればよい。

注射用の溶液剤は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物からなる担体を用いて調製可能である。

けん濁剤は、水、シュクロース、ソルビトール、フラクトース等の糖類、ポリエチレングリコール等のグリコール類、油類を使用して製造できる。

脂肪乳剤化は、例えば目的とする物質、油成分（大豆油、ゴマ油、オリーブ油等の植物油、MCT等）、乳化剤（リン脂質等）等を混合、加熱して溶液とした後に、必要量の水を加え、乳化機（ホモジナイザー、例えば高圧噴射型や超音波型等）を用いて、乳化・均質化处理して行い得る。また、これらを凍結乾燥化することも可能である。なお、脂肪乳剤化するとき、乳化助剤を添加してもよく、乳化助剤としては、例えばグリセリンや糖類（例えばブドウ糖、ソルビトール、果糖等）が例示される。

散剤、丸剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、細粒剤、点滴剤、座剤、吸入剤、点眼剤、点耳剤、軟膏剤、クリーム剤、経皮吸入剤、経粘膜吸収剤等についても、通常用いられる方法により調製可能である。

<実施例>

以下、実施例により本発明についてさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

（正常大腸細胞と比較し、大腸癌細胞において発現が亢進している遺伝子の同定）

正常細胞と比較し、癌細胞において発現が亢進している遺伝子は、バイオエクスプレス（GeneLogic社）のマイクロアレイデータベースを利用して、

同定された。マイクロアレイデータベースには、正常大腸組織細胞 117 サンプル、大腸癌細胞 77 サンプルの各細胞内の発現プロファイルデータが含まれている。発現プロファイルデータはアフィメトリクスヒト遺伝子オリゴチップ HG-U133 を用いた各細胞内の発現データベースとして格納されている。正常大腸組織細胞内での発現量よりも大腸癌細胞内での発現量が多い遺伝子のうち、ヌクレオチドデータベース (DDBJ/EMBL/GenBank) に遺伝子の全長の塩基配列が登録されていない本発明で提供される DNA に係る遺伝子を同定した。117 サンプルの正常大腸組織細胞内における本発明で提供される DNA に係る遺伝子の発現平均量に対する 77 サンプルの大腸癌細胞内における本発明で提供される DNA に係る遺伝子の発現平均量の比は、約 2.38 となった。有意水準は、0.0000001 未満であった。本発明で提供される DNA に係る遺伝子の発現量の比を他の癌細胞において同様に調査した結果、乳癌の場合には約 1.22 (有意水準 0.00243)、肺癌の場合には約 1.52 (有意水準 0.0000001 未満)、胃癌の場合には約 1.98 (有意水準 0.00003)、膵癌の場合には約 1.37 (有意水準 0.0019) の発現量の比を示した。

(遺伝子の取得)

マイクロアレイデータベースのプローブ配列情報に相当する遺伝子として、公共ヌクレオチドデータベース (DDBJ/EMBL/GenBank) 中には、本発明で提供される DNA に係る遺伝子の N 末端欠損 DNA の塩基配列が登録されていた。よって、本発明で提供される DNA に係る遺伝子の N 末端 DNA の塩基配列は、不明であった。

そこで、本発明で提供される DNA の全長配列を次のように決定した。まず、本発明で提供される DNA の全長配列を推定した。最初に、N 末端欠損 DNA の 5' 末端 30 ポリヌクレオチドに係る塩基配列をクエリーとして、ヌクレオチドデータベース (DDBJ/EMBL/GenBank) に対し相同性検索を行った。検索の結果、ヒトゲノム DNA 断片 (アクセッション番号、AL035086) と高い相同性を示した。ヒトゲノム DNA 断片の塩基配列のうち、N 末端欠

損DNAの塩基配列と相同性を有する部分配列を除いて得られる塩基配列（以後、塩基配列Aという）を対象として、塩基配列Aに含まれる開始コドンのうち最も5'末端に近く存在する開始コドンと同定し、塩基配列Aのうち該開始コドン以降の部分配列（以後、推定N末端塩基配列という）を同定した。推定N末端塩基配列の配列長は、183であり、61アミノ酸をコードする部分配列であることが推定された。さらに、N末端欠損DNAの塩基配列をアミノ酸配列に変換したものをクエリーに、ヌクレオチドデータベース（DDBJ/EMBL/GenBank）に対して相同性検索を行った。その結果、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子のマウスオルソログと推察される遺伝子に係るDNAと高い相同性を示した。該DNAの5'末端部分配列（配列長183）をアミノ酸配列に変換したものと、推定N末端塩基配列をアミノ酸配列に変換したものとで相同性検索を行ったところ、良好な相同性（56.1%）を示した。よって、推定N末端塩基配列は、N末端部分DNAの塩基配列であることが推定された。

さらに、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子のcDNAクローニングを行った。センスプライマーとして配列表の配列番号3に記載の塩基配列からなるDNAを、アンチセンスセンスプライマーとして配列表の配列番号4に記載の塩基配列からなるDNAを使用した。鋳型は、QUICK-Clone cDNA（Clontech社）を用い、DNAポリメラーゼとして、KOD-Plus-DNA polymerase（東洋紡社）を用いた。PCR増幅反応は、94℃2分間、94℃30秒、68℃4分を40サイクル行い、続いて68℃3分間処理を行った。得られた増幅産物をpCR4Blunt-TOPOVector（東洋紡社）へライゲーションした。得られた組換えベクター（以後、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子組換えpCR4Blunt-TOPOVectorという）に含まれる本遺伝子に係るDNAの塩基配列の決定は、Long-Read Tower（Amersham Biosciences社）を用いて行った。その結果、本遺伝子にかかるDNAの塩基配列は、配列表の配列番号1に記載の塩基配列であることが判明した。

(正常大腸細胞および大腸癌細胞内における発現量比較)

正常大腸細胞における本発明で提供されるDNAに係る遺伝子の転写産物量が、大腸癌細胞における本発明で提供されるDNAに係る遺伝子の転写産物量よりも少ないことを、以下の手順で確認した。まず、大腸癌細胞HCT116及びSW

5 620を大日本製薬より購入し、両細胞を10%ウシ胎児血清(FCS、岩城硝子社)を含むDMEM培地(Invitrogen)で培養した。一方、正常大腸上皮細胞CCD841ConをAmerican Tissue Culture Collectionより購入し、該細胞をACL-4無血清培地で培養した。これらの細胞から、アイソゲン(日本ジーン社)を用いて、全RNAを抽出した。

10 1μgの全RNAから、RNA PCR Kit (AMV社) Ver. 2.1 (TAKARA社)を用いて30℃ 10分、42℃ 30分、99℃ 5分、5℃ 5分の条件の下、逆転写反応を行った。次に逆転写反応で得られたcDNAのPCR増幅反応を行った。反応は、得られたcDNAの1/10が溶解している溶液に、配列表の配列番号5に記載の塩基配列からなるプライマーおよび配列表の配

15 列番号6に記載の塩基配列からなるプライマーを加えて、Advantage polymerase mix(Clontech社)を用いて行った。反応条件は、94℃ 1.5分、94℃ 30秒、60℃ 30秒、72℃ 1分を30サイクル、最後に72℃ 3分処理とした。反応液を1%アガロースゲルに供与し、電気泳動を行った。泳動後、エチジウムブロマイド染色により、PCR増幅産物を検出した。

20 対照として、グリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素の発現を、同様の方法で、検出した。その結果、対照のグリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素の発現量については、正常大腸細胞および大腸癌細胞間で有意な差異は認められなかった。しかし、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子の発現量については、大腸癌細胞内における発現量が正常大腸細胞内における発現量よりも多いことが明らかと

25 なった(図4)。

(蛋白質の取得)

本遺伝子に係るDNAを組み込んだ発現ベクターを導入した動物細胞を培養す

ることにより、本遺伝子がコードする蛋白質を発現させ、その分子量を、ウェスタンブロット法を用いて測定した。発現ベクターとして、pCMV-Tag4 Vector (Stratagene社)を使用した。本発明で提供されるDNAに係る遺伝子組換えpCR4Blunt-TOPO VectorをBamHI
5 およびXhoIで切断し得られたDNAフラグメントと、BamHIおよびXhoIで切断されたpCMV-Tag4 Vectorとを混合し、本遺伝子に係るDNA (以後、hC1Sという)を組み込んだ発現ベクター (以後、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子組換えpCMV-Tag4 Vectorという)を得た。動物細胞には、293細胞を用いた。まず、10% FCS含有DMEM培
10 地 (Invitrogen社)で293細胞をサブコンフルエント状態に至るまで、培養した。培養後、培地をOptiMEMI (Invitrogen社)に交換した。交換後、4 μ gの本発明で提供されるDNAに係る遺伝子組換えpCMV-Tag4 Vectorを、リポフェクトアミンプラス (Invitrogen社)を用い、リポフェクション法により、293細胞に導入した。対照とし
15 て本遺伝子が組み込まれていないpCMV-Tag4 Vectorを、リポフェクトアミンプラス (Invitrogen社)を用い、リポフェクション法により、293細胞に導入した。

導入時から5時間経過後、遺伝子導入された細胞の培養液に20% FCS含有OptiMEMI培地を、培養液の最終血清濃度が10%になるように、加えた。
20 更に翌日、遺伝子導入された細胞の培地を10% FCS含有DMEM培地に交換した。遺伝子導入時から48時間経過後、細胞を溶解するための溶液 (1% トリトンX、50mM Tris塩酸pH 7.4、300mM NaCl、5mM EDTA、コンプリートプロテアーゼ阻害剤カクテルEDTAフリー、ロッシュ社)を加え、遺伝子導入された細胞を溶解した。氷冷下30分間放置した後、溶液 (以
25 後、溶解後溶液という)を回収、遠心処理 (15000回転、15分間)した。遠心処理後、上清にBSA処理IgGアガロースゲル (シグマ)を加え、一晚4℃で放置した。翌日、上清に抗FLAGM2アガロースゲル (シグマ社)を加え、3.5時間4℃で抗原抗体反応させた後、洗浄液 (0.1% トリトンX、50mM

Tris 塩酸 pH 7.4、300 mM NaCl、5 mM EDTA) で3回、リン酸緩衝液で1回洗浄した。抗FLAGM2アガロースゲルと結合した蛋白質は、10% 2-メルカプトエタノール含有サンプル緩衝液で回収した。回収溶液ならびに溶解後溶液を、4-20% SDSゲルに供与し、電気泳動を行った。泳動後、泳動産物をニトロセルロースフィルター (Schleicher and Schuell 社) へ転写した。転写後、BSAブロッキングを行い、抗FLAGM2抗体 (シグマ社) および過酸化水素脱水素酵素で標識された抗マウスIg抗体 (Amersham社) と泳動産物を反応させ、4-クロロ-1-ナフトールで発色させた。免疫沈降させずに溶解後溶液を直接用いた場合には、本発明で提供される蛋白質を検出することができなかった。しかし、抗FLAGM2アガロースゲルで免疫沈降させた場合には、本発明で提供される蛋白質を、検出できた。検出の結果、本発明で提供される蛋白質の分子量は、約110 kDaであることが明らかとなった (図5)。

(本発明で提供されるDNAに係る遺伝子がコードする蛋白質の細胞増殖促進活性)

24および12穴のプレート上に、10% FCS含有DMEM培地を用いて293細胞を播種し、サブコンフルエント状態になるまで培養を行った。培養後、 $0.4 \mu\text{g}$ (24穴) あるいは $0.7 \mu\text{g}$ (12穴) の本発明で提供されるDNAに係る遺伝子組換えpCMV-Tag4 Vectorを、リポフェクトアミンプラス (Invitrogen社) を用い、293細胞へ導入した。対照として本発明で提供されるDNAに係る遺伝子が組み込まれていないpCMV-Tag4 Vectorを、リポフェクトアミンプラス (Invitrogen社) を用い、293細胞へ導入した。翌日、細胞を10% FCS含有DMEM培地中、10cmプレートに巻きなおし、G418 (Promega社) を終濃度 1 mg/ml となるように、追加した。 1 mg/ml 濃度のG418 (Promega社) を含んだ培地を3ないし4日ごとに交換し、10-14日間培養することによりコロニーを形成させた。形成したコロニーを0.2%クリスタルバイオレットで染色した。その結果、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子を細胞に導入し、強

制発現させると、細胞増殖促進させることがわかった。この結果は、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子がコードする蛋白質が、細胞増殖促進活性を有することを示すものである（図6）。

- 5 （本発明で提供されるDNAに係る遺伝子がコードする蛋白質の細胞内局在性）
- 本発明で提供されるDNAに係る遺伝子がコードする蛋白質の細胞内での局在を以下の手順で決定した。10cmプレートでサブコンフルエント状態の293細胞に前述の方法で、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子組換えベクター、pCMV-Tag4、を導入した。48時間後、細胞を0.5 ml のミトコン
- 10 ドリア単離緩衝液（MIB; 200 mMマンニトール、70 mM スクロース、35 mM 2-メルカプトエタノール、5 mM EDTA、50 mM リン酸カリウム、コンプリートプロテアーゼ阻害剤カクテルEDTAフリー、pH7.3）中に回収した。細胞をホモジナイザーで破碎懸濁した後、600 g 4°Cで2回遠心沈殿を行った。上清をさらに15000 rpm 4°Cで20分間遠心した。
- 15 上清（細胞質分画）、沈殿（ミトコンドリア分画）おのおの、最初の懸濁液の1/5相当量を抗FLAG抗体を用いた前述のウエスタンブロット、あるいは抗ミトコンドリアHSP70抗体（1/500希釈、Affinity Bioreagent）を用いたウエスタンブロットに供した。本発明で提供されるDNAに係る遺伝子がコードする蛋白質と思われるバンドはミトコンドリア分画にだけ検出
- 20 され、本遺伝子の配列分析から予測されたミトコンドリア局在性を示した（図7上段）。また、抗ミトコンドリアHSP70もミトコンドリア分画にのみ検出され、分画実験操作の妥当性は証明された（図7下段）。

- （本発明で提供されるDNAに係る遺伝子がコードする蛋白質のシグナルペプチド切断部位）
- 25

 前述の方法で、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子がコードする蛋白質を293細胞で発現し、抗FLAGM2アガロースゲルにより精製し、4-20% SDSゲル電気泳動で分離した。その後、ゲル内の蛋白質をPVDF膜（ファル

マシア) に転写し、クマジー R 2 5 0 液で染色した。1 1 0 K d a 付近のバンドで示され、かつ本発明で提供される DNA に係る遺伝子がコードする蛋白質と考えられる蛋白質の N 末を東レリサーチセンターで決定した。結果は S S G G G であり、予想通り、ミトコンドリアターゲット配列と考えられた位置 (配列表 2 の 3 1 番目 A l a と 3 2 番目 S e r の間) で切断されていた。

(発現パターンに基づく、DHFR、TS など既存の抗癌剤標的に対し、本発明で提供される DNA に係る遺伝子の標的としての優位性)

既存の抗癌剤標的であるジヒドロ化葉酸還元化酵素 (DHFR : メトトレキサートの標的)、チミジル酸合成酵素 (TS : 5 - フルオロウリジンの標的) と本発明で提供される DNA に係る遺伝子間で、ヒト臓器における発現パターンをバイオエクスプレスのマイクロアレイデータベースを用いて比較した (図 8) 。正常大腸組織と比べ、大腸癌における発現強度は DHFR 遺伝子で 1 . 1 倍、TS 遺伝子で 1 . 5 倍の上昇であった。一方、本発明で提供される DNA に係る遺伝子は前述の通り 2 . 3 8 倍発現が亢進していた。さらに、増殖細胞を多く抱える正常組織、胸腺に注目すると、ここでの DHFR 遺伝子の発現は、正常大腸組織に対し 2 . 5 倍という値であった。同様に、TS 遺伝子の胸腺での発現は 5 . 5 倍の値であった。胸腺でこれらの遺伝子の発現が高いために、これら遺伝子を標的とする抗癌剤、メトトレキサートや 5 - フルオロウリジンの副作用が発現しやすくなっていると考えられる。ところが、本発明で提供される DNA に係る遺伝子の発現は、胸腺でも正常大腸組織での 1 . 4 倍という値であった。このように、本発明で提供される DNA に係る遺伝子は癌組織で発現が亢進している上に、通常増殖に関与する遺伝子 (例えば DHFR や TS 遺伝子) の発現が上昇する、胸腺のような組織においても、顕著な高発現がみられない。従って、本発明で提供される DNA に係る遺伝子は、ここで比較した他の 2 種の抗癌剤標的よりも、副作用の少ない抗がん剤の提供などの点において有利な抗癌剤標的とみなせる。

(大腸癌の発癌過程における、W n t 経路を通したミトコンドリアでの C 1 代謝

の活性化と本発明の遺伝子の有用性)

大腸癌の場合、ポリープ状の前がん状態から β カテニンによる遺伝子発現攪乱により癌状態へ移行することで発癌すると考えられている(非特許文献11)。Wnt遺伝子シグナル経路の活性化を引き起こす変異、換言すればAPC遺伝子を不活性化する、あるいは β カテニンを活性化するような変異は、 β カテニンの核内蓄積をもたらし、ひいては β カテニンと転写因子Tcf/LEFの複合体を形成させる。約90%の大腸癌でWnt遺伝子シグナル経路の活性化を引き起こす変異がみられることが知られている(非特許文献12)。この β カテニン経路の標的遺伝子のひとつとしてc-myc癌遺伝子が存在する(非特許文献13)。mycは細胞増殖、分化、アポトーシスに関わる重要な転写因子であるが(非特許文献14)、詳細なメカニズムは未だ詳らかではない。最近、ミトコンドリアセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ(mtSHMT)がmycの標的遺伝子であることが明らかとなってきたが(非特許文献15、16)、この遺伝子産物はセリンとテトラヒドロ葉酸からグリシンと5, 10メチレンテトラ葉酸を合成する反応およびその逆反応を触媒し、C1-THFSとともに1炭素単位代謝に関わっている。また、他の研究において、マウスでc-mycが転写を引き起こす遺伝子としてU06665というクローンが同定されてきたが(非特許文献17)、この遺伝子は、本発明で提供されるDNAに係る遺伝子のマウスオルソログの一部であることが発明者の分析により明らかとなった。こういった事実を総合的に考えてみると、ミトコンドリアという同じ細胞内部位で、しかも一つの代謝経路中で協力している遺伝子群が、協調的な遺伝子の制御下にあると考えるのはたいへん理にかなったことといえる。そこで、発明者は、Wntシグナル経路が活性化することでミトコンドリアの炭素単位代謝が活性化される現象が大腸癌の発癌過程で重要な役目を担っていると考えている(図9)。本発明で提供されるDNAに係る遺伝子はこの過程の根幹をなす遺伝子といえ、それゆえ、抗癌剤標的となりうる(非特許文献20)。

本発明を詳細にまた特定の実施態様を参照して説明したが、本発明の精神と範

囲を逸脱することなく様々な変更や修正を加えることができることは当業者にとって明らかである。

本出願は、2003年9月30日出願の日本特許出願（特願 2003-341245）に基づくものであり、その内容はここに参照として取り込まれる。

5

<産業上の利用可能性>

本発明は、癌細胞において正常細胞と比較し発現が亢進している新規 C1-T HFS 遺伝子を提供するものである。本遺伝子に係る DNA は、細胞増殖促進活性を有する蛋白質をコードする。本特性を利用した新規医薬組成物、診断手段の

10 提供は、大腸癌の臨床・基礎の医用領域において大きな有用性を提供する。

<配列表フリーテキスト>

配列番号 1 : (1) : (2934) 本蛋白質全長をコードする領域

配列番号 1 : (1) : (183) N末端部分 DNA

15 配列番号 1 : (184) : (2934) N末端欠損 DNA

請 求 の 範 囲

1. 以下の (a)、(b) のいずれかの DNA :

(a) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列の 9 4 番目から 2 9 3 4 番目の塩基

5 配列で表される DNA、

(b) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列で表される DNA。

2. 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列の 9 4 番目から 2 9 3 4 番目の塩
基配列を含み、かつ、1 0-ホルミルテトラヒドロ葉酸合成酵素活性、5, 1 0
10 -メテニルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼ活性および 5, 1 0-メチレン
テトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ活性の 3 つの活性、および／または、細胞増
殖促進活性を有する蛋白質をコードする DNA。

3. 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列で表される DNA である、請求項
15 2 に記載の DNA。

4. 請求項 1 から請求項 3 のいずれかに記載の DNA の DNA 配列におい
て 1 ないし複数の DNA の欠失、置換、付加された塩基配列を有し、かつ細胞増
殖促進活性を有する蛋白質をコードする DNA。

20 5. 請求項 1 から請求項 4 のいずれか 1 項に記載の DNA を含有する DN
A、該 DNA の相補鎖、請求項 1 から請求項 4 のいずれか 1 項に記載の DNA の
部分塩基配列で表される DNA および該 DNA の相補鎖のうちすくなくともいず
れか 1 つにストリンジェントな条件でハイブリダイズする DNA。

25 6. 以下の群より選ばれる DNA であって、請求項 1 から請求項 4 のいず
れか 1 項に記載の DNA を含有する DNA、該 DNA の相補鎖、請求項 1 から請
求項 4 のいずれか 1 項に記載の DNA の部分塩基配列で表される DNA および該

DNAの相補鎖のうちすくなくともいずれか1つを増幅するためのプライマーおよび／または検出するためのプローブである請求項5に記載のDNA；

(i) 配列表の配列番号3に記載の塩基配列で表されるDNA、

(ii) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列で表されるDNA、

5 (iii) 配列表の配列番号5に記載の塩基配列で表されるDNA

および

(iv) 配列表の配列番号6に記載の塩基配列で表されるDNA。

7. 請求項1から請求項4のいずれか1項に記載のDNAを含有する組換えベクター。

8. プラスミドFERMBP-8419号。

9. 請求項7に記載の組換えベクターまたは請求項8に記載のプラスミドにより形質転換された形質転換体。

10. 以下の(a)から(b)のいずれかの蛋白質。

(a) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列の32番目から978番目のアミノ酸配列で表される蛋白質。

20 (b) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質。

11. 請求項4に記載のDNAがコードする蛋白質。

12. 請求項7に記載の組換えベクターまたは請求項8に記載のプラスミドにより形質転換された形質転換体を培養する工程を含む、請求項10または11に記載の蛋白質の製造方法。

13. 請求項10または11に記載の蛋白質または該蛋白質の断片を抗原

とする抗体。

14. 請求項10または11に記載の蛋白質が有する細胞増殖促進活性を
5 阻害する化合物の同定方法であって、ある化合物と請求項10または11に記載
の蛋白質との相互作用を可能にする条件下で、細胞増殖促進活性の存在、非存在
または変化を検出することにより、該化合物が請求項10または11に記載の蛋
白質の細胞増殖促進活性を阻害するか否かを判定することを特徴とする同定方法。

15 15. 請求項10または11に記載の蛋白質が有する細胞増殖促進活性を
阻害する化合物の同定方法であって、請求項10または11に記載の蛋白質、請
求項1から請求項4のいずれか1項に記載のDNA、請求項5または6に記載の
DNA、請求項7に記載の組換えベクターまたは請求項8に記載のプラスミド、
請求項9に記載の形質転換体および請求項13に記載の抗体のうち少なくとも
いずれか1つを用いることを特徴とする同定方法。

16. ある組織が大腸癌由来組織であるか否かを判定する方法であって、
ある組織における請求項1から請求項4のいずれか1項に記載のDNAの発現量
を測定することを特徴とする判定方法。

20 17. 請求項16に記載の判定方法であって、ある組織における請求項1
から請求項4のいずれか1項に記載のDNAの発現量が、対照である正常大腸由
来組織における請求項1から請求項4のいずれか1項に記載のDNAの発現量の
3倍以上である場合に、ある組織が大腸癌由来組織であると判定することを特徴
とする判定方法。

25 18. 請求項17に記載の判定方法であって、ある組織における請求項1
から請求項4のいずれか1項に記載のDNAの発現量を以下の工程により測定す
ることを特徴とする判定方法；

(i) ある組織に含まれるRNAを鋳型に、逆転写反応を行う工程、

(ii) 逆転写反応により合成されたcDNAを鋳型に、配列表の配列番号5および6に記載の塩基配列で表されるDNAをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応を行う工程および

5 (iii) ポリメラーゼ連鎖反応により増幅されたDNAの量を測定する工程。

19. 請求項5または6に記載のDNAおよび請求項13に記載の抗体のうち少なくともいずれか1つを含有することを特徴とする大腸癌の判定キットであって、請求項16から請求項18のいずれか1項に記載の判定方法に用いること
10 とを特徴とする大腸癌の判定キット。

20. 請求項10または11に記載の蛋白質の阻害剤を含んでなる大腸癌の防止剤および／または治療剤。

図1

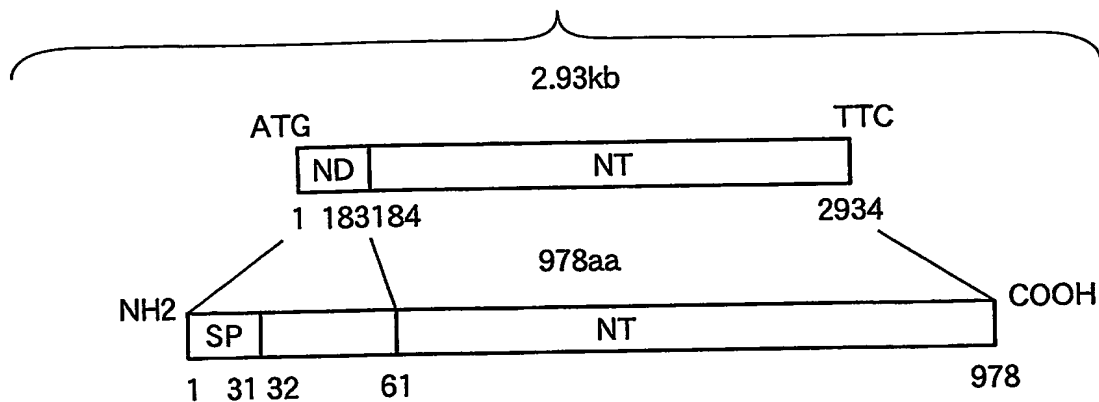


図2

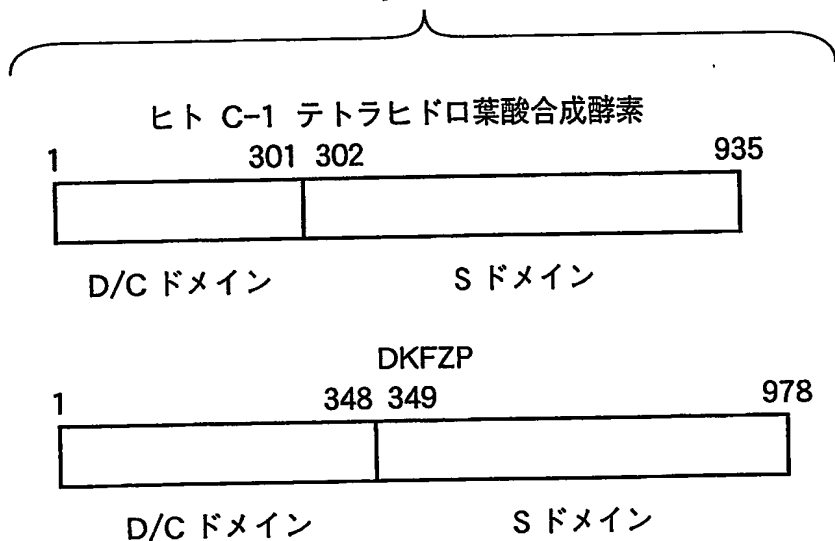


図3

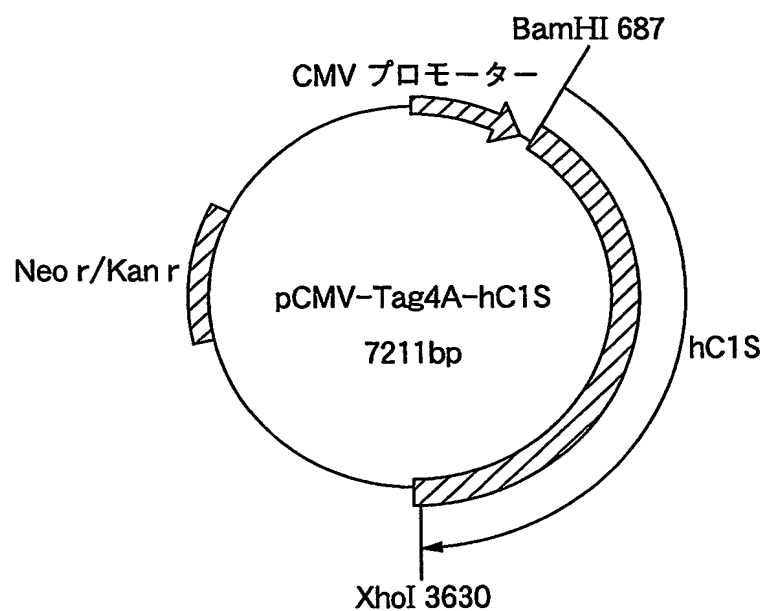


図4

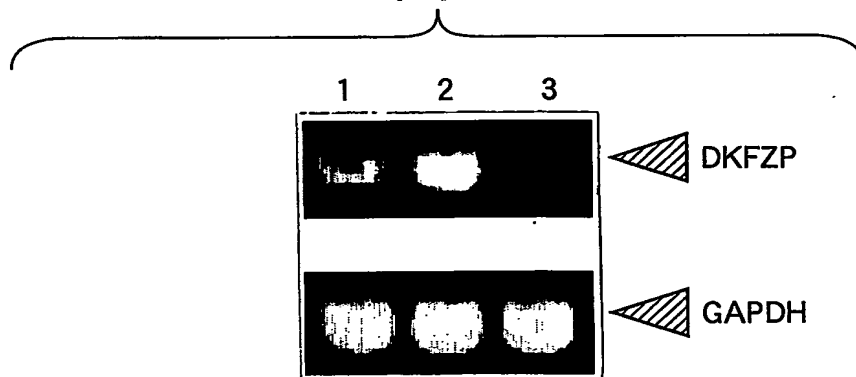


図5

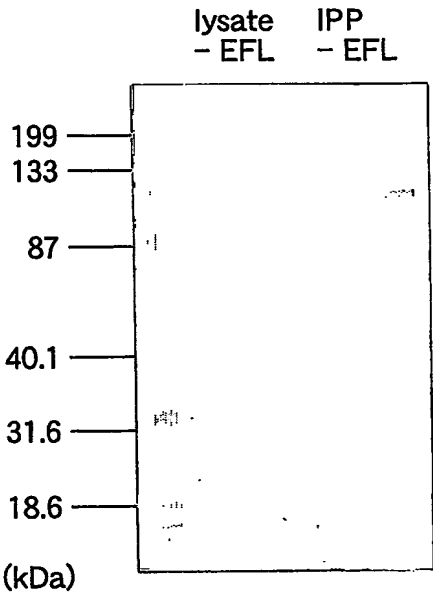


図6

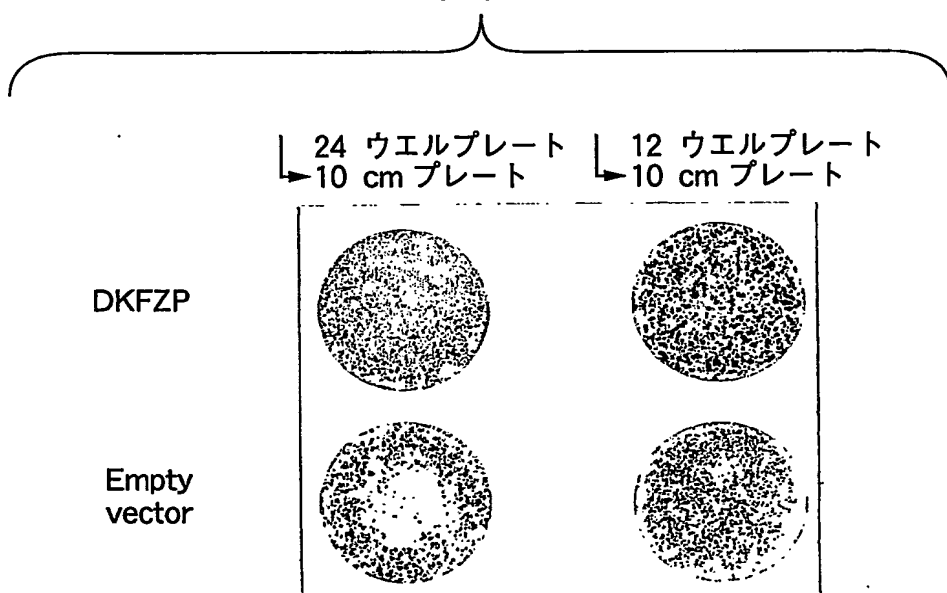


図7

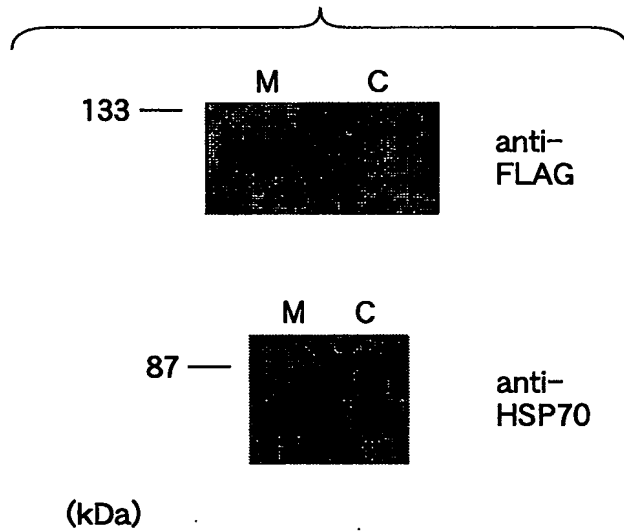


図8

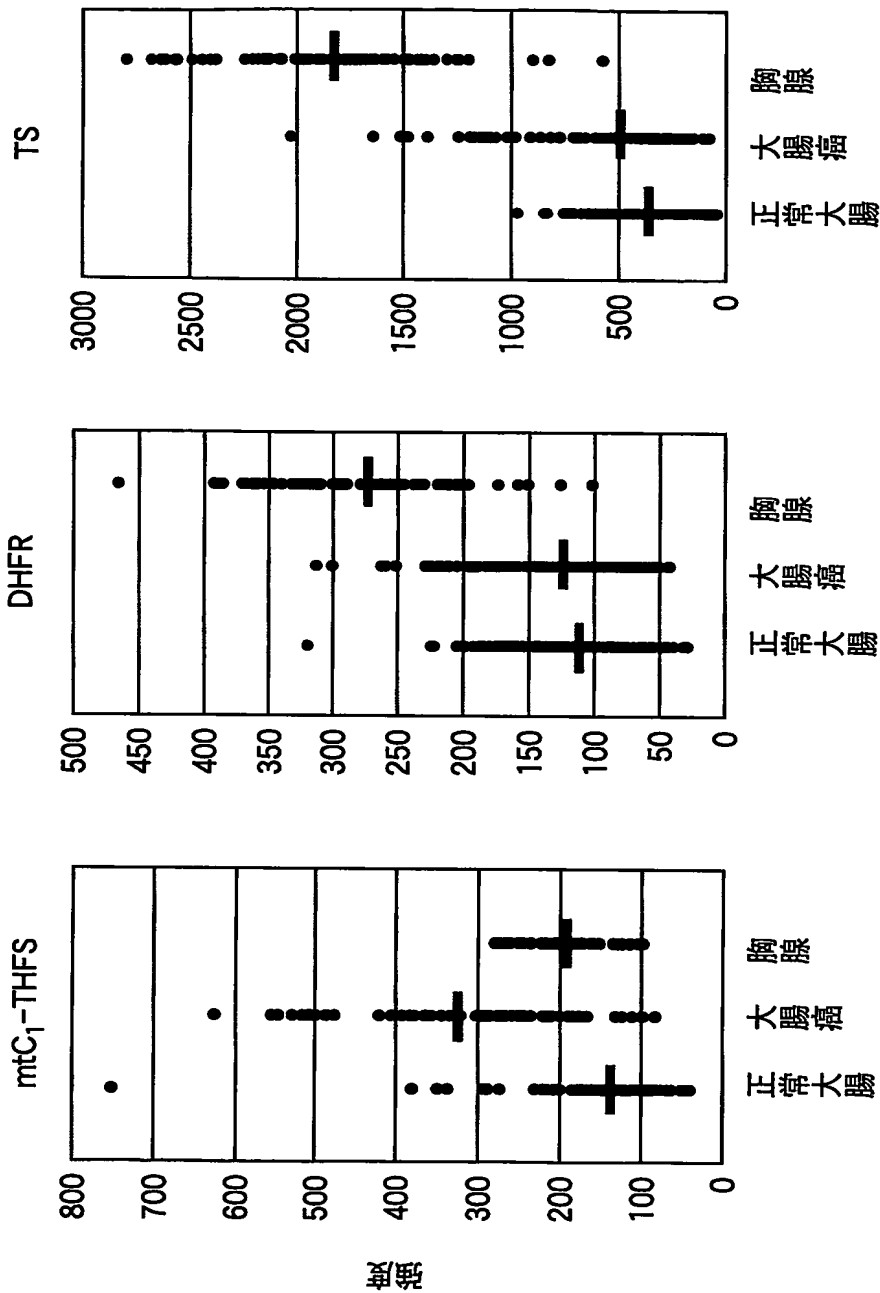
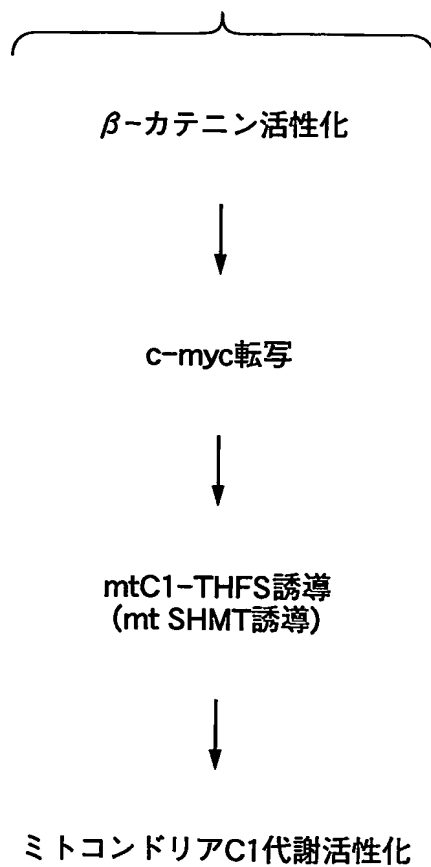


図9



SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> A novel Cl-tetrahydrofolate synthase gene

<130> P05024100

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2934

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (2934)

<223>

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1).. (93)

<223>

<400> 1

atg ggc acg cgt ctg ccg ctc gtc ctg cgc cag ctc cgc cgc ccg ccc	48
Met Gly Thr Arg Leu Pro Leu Val Leu Arg Gln Leu Arg Arg Pro Pro	
1 5 10 15	

cag ccc ccg ggc cct ccg cgc cgc ctc cgt gtg ccc tgt cgc gct agc	96
Gln Pro Pro Gly Pro Pro Arg Arg Leu Arg Val Pro Cys Arg Ala Ser	
20 25 30	

agc ggc ggc ggc gga ggc ggc ggc ggt ggc cgg gag ggc ctg ctt gga	144
Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Glu Gly Leu Leu Gly	
35 40 45	

cag cgg cgg ccg cag gat ggc cag gcc cgg agc agc tgc agc ccc ggc	192
Gln Arg Arg Pro Gln Asp Gly Gln Ala Arg Ser Ser Cys Ser Pro Gly	
50 55 60	

ggc cga acg ccc gcg gcg cgg gac tcc atc gtc aga gaa gtc att cag	240
Gly Arg Thr Pro Ala Ala Arg Asp Ser Ile Val Arg Glu Val Ile Gln	
65 70 75 80	

aat tca aaa gaa gtt cta agt tta ttg caa gaa aaa aac cct gcc ttc	288
Asn Ser Lys Glu Val Leu Ser Leu Leu Gln Glu Lys Asn Pro Ala Phe	
85 90 95	

aag ccg gtt ctt gca att atc cag gca ggt gac gac aac ttg atg cag	336
Lys Pro Val Leu Ala Ile Ile Gln Ala Gly Asp Asp Asn Leu Met Gln	
100 105 110	

gaa atc aac cag aat ttg gct gag gag gct ggt ctg aac atc act cac Glu Ile Asn Gln Asn Leu Ala Glu Glu Ala Gly Leu Asn Ile Thr His 115 120 125	384
att tgc ctc cct cca gat agc agt gaa gcc gag att ata gat gaa atc Ile Cys Leu Pro Pro Asp Ser Ser Glu Ala Glu Ile Ile Asp Glu Ile 130 135 140	432
tta aag atc aat gaa gat acc aga gta cat ggc ctt gcc ctt cag atc Leu Lys Ile Asn Glu Asp Thr Arg Val His Gly Leu Ala Leu Gln Ile 145 150 155 160	480
tct gag aac ttg ttt agc aac aaa gtc ctc aat gcc ttg aaa cca gaa Ser Glu Asn Leu Phe Ser Asn Lys Val Leu Asn Ala Leu Lys Pro Glu 165 170 175	528
aaa gat gtg gat gga gta aca gac ata aac ctg ggg aag ctg gtg cga Lys Asp Val Asp Gly Val Thr Asp Ile Asn Leu Gly Lys Leu Val Arg 180 185 190	576
ggg gat gcc cat gaa tgt ttt gtt tca cct gtt gcc aaa gct gta att Gly Asp Ala His Glu Cys Phe Val Ser Pro Val Ala Lys Ala Val Ile 195 200 205	624
gaa ctt ctt gaa aaa tca ggt gtc aac cta gat gga aag aag att ttg Glu Leu Leu Glu Lys Ser Gly Val Asn Leu Asp Gly Lys Lys Ile Leu 210 215 220	672
gta gtg ggg gcc cat ggg tct ttg gaa gct gct cta caa tgc ctg ttc Val Val Gly Ala His Gly Ser Leu Glu Ala Ala Leu Gln Cys Leu Phe 225 230 235 240	720
cag aga aaa ggg tcc atg aca atg agc atc cag tgg aaa aca cgc cag Gln Arg Lys Gly Ser Met Thr Met Ser Ile Gln Trp Lys Thr Arg Gln 245 250 255	768
ctt caa agc aag ctt cac gag gct gac att gtg gtc cta ggc tca cct Leu Gln Ser Lys Leu His Glu Ala Asp Ile Val Val Leu Gly Ser Pro 260 265 270	816
aag cca gaa gag att ccc ctt act tgg ata caa cca gga act act gtt Lys Pro Glu Glu Ile Pro Leu Thr Trp Ile Gln Pro Gly Thr Thr Val 275 280 285	864
ctc aac tgc tcc cat gac ttc ctg tca ggg aag gtt ggg tgt ggc tct Leu Asn Cys Ser His Asp Phe Leu Ser Gly Lys Val Gly Cys Gly Ser 290 295 300	912
cca aga ata cat ttt ggt gga ctc att gag gaa gat gat gtg att ctc Pro Arg Ile His Phe Gly Gly Leu Ile Glu Glu Asp Asp Val Ile Leu 305 310 315 320	960
ctt gct gca gct ctg cga att cag aac atg gtc agt agt gga agg aga Leu Ala Ala Ala Leu Arg Ile Gln Asn Met Val Ser Ser Gly Arg Arg 325 330 335	1008
tgg ctt cgt gaa cag cag cac agg cgg tgg aga ctt cac tgc ttg aaa	1056

Trp Leu Arg Glu Gln Gln His Arg Arg Trp Arg Leu His Cys Leu Lys	
340 345 350	
ctt cag cct ctc tcc cct gtg cca agt gac att gag att tca aga gga	1104
Leu Gln Pro Leu Ser Pro Val Pro Ser Asp Ile Glu Ile Ser Arg Gly	
355 360 365	
caa act cca aaa gct gtg gat gtc ctt gcc aag gag att gga ttg ctt	1152
Gln Thr Pro Lys Ala Val Asp Val Leu Ala Lys Glu Ile Gly Leu Leu	
370 375 380	
gca gat gaa att gaa atc tat ggc aaa agc aaa gcc aaa gta cgt ttg	1200
Ala Asp Glu Ile Glu Ile Tyr Gly Lys Ser Lys Ala Lys Val Arg Leu	
385 390 395 400	
tcc gtg cta gaa agg tta aag gat caa gca gat gga aaa tac gtc tta	1248
Ser Val Leu Glu Arg Leu Lys Asp Gln Ala Asp Gly Lys Tyr Val Leu	
405 410 415	
gtt gct ggg atc aca ccc acc cct ctt gga gaa ggg aag agc aca gtc	1296
Val Ala Gly Ile Thr Pro Thr Pro Leu Gly Glu Gly Lys Ser Thr Val	
420 425 430	
acc atc ggg ctt gtg cag gct ctg acc gca cac ctg aat gtc aac tcc	1344
Thr Ile Gly Leu Val Gln Ala Leu Thr Ala His Leu Asn Val Asn Ser	
435 440 445	
ttt gcc tgc ttg agg cag cct tcc caa gga ccg acg ttt gga gtg aaa	1392
Phe Ala Cys Leu Arg Gln Pro Ser Gln Gly Pro Thr Phe Gly Val Lys	
450 455 460	
gga gga gcc gcg ggt ggt gga tat gcc cag gtc atc ccc atg gag gag	1440
Gly Gly Ala Ala Gly Gly Gly Tyr Ala Gln Val Ile Pro Met Glu Glu	
465 470 475 480	
ttc aac ctt cac ttg act gga gac atc cac gcc atc acc gct gcc aat	1488
Phe Asn Leu His Leu Thr Gly Asp Ile His Ala Ile Thr Ala Ala Asn	
485 490 495	
aac ttg ctg gct gcc gcc atc gac acg agg att ctt cat gaa aac acg	1536
Asn Leu Leu Ala Ala Ala Ile Asp Thr Arg Ile Leu His Glu Asn Thr	
500 505 510	
caa aca gat aag gct ctg tat aat cgg ctg gtt cct tta gtg aat ggt	1584
Gln Thr Asp Lys Ala Leu Tyr Asn Arg Leu Val Pro Leu Val Asn Gly	
515 520 525	
gtc aga gaa ttt tca gaa att cag ctt gct cgg cta aaa aaa ctg gga	1632
Val Arg Glu Phe Ser Glu Ile Gln Leu Ala Arg Leu Lys Lys Leu Gly	
530 535 540	
ata aat aag act gat ccg agc aca ctg aca gaa gag gaa gtg agt aaa	1680
Ile Asn Lys Thr Asp Pro Ser Thr Leu Thr Glu Glu Glu Val Ser Lys	
545 550 555 560	
ttt gcc cgt ctc gac atc gac cca tct acc atc acg tgg cag aga gta	1728
Phe Ala Arg Leu Asp Ile Asp Pro Ser Thr Ile Thr Trp Gln Arg Val	

565	570	575	
ttg gat aca aat gac cga ttt cta cga aaa ata acc atc ggg cag gga Leu Asp Thr Asn Asp Arg Phe Leu Arg Lys Ile Thr Ile Gly Gln Gly 580 585 590			1776
aac aca gag aag ggc cat tac cgg cag gcg cag ttt gac atc gca gtg Asn Thr Glu Lys Gly His Tyr Arg Gln Ala Gln Phe Asp Ile Ala Val 595 600 605			1824
gcc agc gag atc atg gcg gtg ctg gcc ctg acg gac agc ctc gca gac Ala Ser Glu Ile Met Ala Val Leu Ala Leu Thr Asp Ser Leu Ala Asp 610 615 620			1872
atg aag gca cgg ctg gga agg atg gtg gtg gcc agt gac aaa agc ggg Met Lys Ala Arg Leu Gly Arg Met Val Val Ala Ser Asp Lys Ser Gly 625 630 635 640			1920
cag cct gtg aca gca gat gat ttg ggg gtg aca ggt gct ttg aca gtt Gln Pro Val Thr Ala Asp Asp Leu Gly Val Thr Gly Ala Leu Thr Val 645 650 655			1968
ttg atg aaa gat gca ata aaa cca aac ctg atg cag acc ctg gaa ggg Leu Met Lys Asp Ala Ile Lys Pro Asn Leu Met Gln Thr Leu Glu Gly 660 665 670			2016
aca cct gtg ttc gtg cat gcg ggc cct ttt gct aac att gct cac ggc Thr Pro Val Phe Val His Ala Gly Pro Phe Ala Asn Ile Ala His Gly 675 680 685			2064
aac tct tca gtg ttg gct gat aaa att gcc ctg aaa ctg gtt ggt gaa Asn Ser Ser Val Leu Ala Asp Lys Ile Ala Leu Lys Leu Val Gly Glu 690 695 700			2112
gaa gga ttt gta gtg acc gaa gct ggc ttt ggt gct gac atc gga atg Glu Gly Phe Val Val Thr Glu Ala Gly Phe Gly Ala Asp Ile Gly Met 705 710 715 720			2160
gag aaa ttc ttc aac atc aag tgc cga gct tcc ggc ttg gtg ccc aac Glu Lys Phe Phe Asn Ile Lys Cys Arg Ala Ser Gly Leu Val Pro Asn 725 730 735			2208
gtg gtt gtg tta gtg gca acg gtg cga gct ctg aag atg cat gga ggc Val Val Val Leu Val Ala Thr Val Arg Ala Leu Lys Met His Gly Gly 740 745 750			2256
ggg cca agt gta acg gct ggt gtt cct ctt aag aaa gaa tat aca gag Gly Pro Ser Val Thr Ala Gly Val Pro Leu Lys Lys Glu Tyr Thr Glu 755 760 765			2304
gag aac atc cag ctg gtg gca gac ggc tgc tgt aac ctc cag aag caa Glu Asn Ile Gln Leu Val Ala Asp Gly Cys Cys Asn Leu Gln Lys Gln 770 775 780			2352
att cag atc act cag ctc ttt ggg gtt ccc gtt gtg gtg gct ctg aat Ile Gln Ile Thr Gln Leu Phe Gly Val Pro Val Val Val Ala Leu Asn 785 790 795 800			2400

gtc ttc aag acc gac acc cgc gct gag att gac ttg gtg tgt gag ctt Val Phe Lys Thr Asp Thr Arg Ala Glu Ile Asp Leu Val Cys Glu Leu 805 810 815	2448
gca aag cgg gct ggt gcc ttt gat gca gtc ccc tgc tat cac tgg tcg Ala Lys Arg Ala Gly Ala Phe Asp Ala Val Pro Cys Tyr His Trp Ser 820 825 830	2496
gtt ggt gga aaa gga tcg gtg gac ttg gct cgg gct gtg aga gag gct Val Gly Gly Lys Gly Ser Val Asp Leu Ala Arg Ala Val Arg Glu Ala 835 840 845	2544
gcg agt aaa aga agc cga ttc cag ttc ctg tat gat gtt cag gtt cca Ala Ser Lys Arg Ser Arg Phe Gln Phe Leu Tyr Asp Val Gln Val Pro 850 855 860	2592
att gtg gac aag ata agg acc att gct cag gct gtc tat gga gcc aaa Ile Val Asp Lys Ile Arg Thr Ile Ala Gln Ala Val Tyr Gly Ala Lys 865 870 875 880	2640
gat att gaa ctc tct cct gag gca caa gcc aaa ata gat cgt tac act Asp Ile Glu Leu Ser Pro Glu Ala Gln Ala Lys Ile Asp Arg Tyr Thr 885 890 895	2688
caa cag ggt ttt gga aat ttg ccc atc tgc atg gca aag acc cac ctt Gln Gln Gly Phe Gly Asn Leu Pro Ile Cys Met Ala Lys Thr His Leu 900 905 910	2736
tct cta tct cac caa cct gac aaa aaa ggt gtg cca agg gac ttc atc Ser Leu Ser His Gln Pro Asp Lys Lys Gly Val Pro Arg Asp Phe Ile 915 920 925	2784
tta cct atc agt gac gtc cgg gcc agc ata ggc gct ggg ttc att tac Leu Pro Ile Ser Asp Val Arg Ala Ser Ile Gly Ala Gly Phe Ile Tyr 930 935 940	2832
cct ttg gtc gga acg atg agc acc atg cca gga ctg ccc acc cgg ccc Pro Leu Val Gly Thr Met Ser Thr Met Pro Gly Leu Pro Thr Arg Pro 945 950 955 960	2880
tgc ttt tat gac ata gat ctt gat acc gaa aca gaa caa gtt aaa ggc Cys Phe Tyr Asp Ile Asp Leu Asp Thr Glu Thr Glu Gln Val Lys Gly 965 970 975	2928
ttg ttc Leu Phe	2934

<210> 2
 <211> 978
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Thr Arg Leu Pro Leu Val Leu Arg Gln Leu Arg Arg Pro Pro
 1 5 10 15

Gln Pro Pro Gly Pro Pro Arg Arg Leu Arg Val Pro Cys Arg Ala Ser
 20 25 30

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Glu Gly Leu Leu Gly
 35 40 45

Gln Arg Arg Pro Gln Asp Gly Gln Ala Arg Ser Ser Cys Ser Pro Gly
 50 55 60

Gly Arg Thr Pro Ala Ala Arg Asp Ser Ile Val Arg Glu Val Ile Gln
 65 70 75 80

Asn Ser Lys Glu Val Leu Ser Leu Leu Gln Glu Lys Asn Pro Ala Phe
 85 90 95

Lys Pro Val Leu Ala Ile Ile Gln Ala Gly Asp Asp Asn Leu Met Gln
 100 105 110

Glu Ile Asn Gln Asn Leu Ala Glu Glu Ala Gly Leu Asn Ile Thr His
 115 120 125

Ile Cys Leu Pro Pro Asp Ser Ser Glu Ala Glu Ile Ile Asp Glu Ile
 130 135 140

Leu Lys Ile Asn Glu Asp Thr Arg Val His Gly Leu Ala Leu Gln Ile
 145 150 155 160

Ser Glu Asn Leu Phe Ser Asn Lys Val Leu Asn Ala Leu Lys Pro Glu
 165 170 175

Lys Asp Val Asp Gly Val Thr Asp Ile Asn Leu Gly Lys Leu Val Arg
 180 185 190

Gly Asp Ala His Glu Cys Phe Val Ser Pro Val Ala Lys Ala Val Ile
 195 200 205

Glu Leu Leu Glu Lys Ser Gly Val Asn Leu Asp Gly Lys Lys Ile Leu
 210 215 220

Val Val Gly Ala His Gly Ser Leu Glu Ala Ala Leu Gln Cys Leu Phe

225	230	235	240
Gln Arg Lys Gly Ser Met Thr Met Ser Ile Gln Trp Lys Thr Arg Gln			
	245	250	255
Leu Gln Ser Lys Leu His Glu Ala Asp Ile Val Val Leu Gly Ser Pro			
	260	265	270
Lys Pro Glu Glu Ile Pro Leu Thr Trp Ile Gln Pro Gly Thr Thr Val			
	275	280	285
Leu Asn Cys Ser His Asp Phe Leu Ser Gly Lys Val Gly Cys Gly Ser			
	290	295	300
Pro Arg Ile His Phe Gly Gly Leu Ile Glu Glu Asp Asp Val Ile Leu			
	305	310	315
Leu Ala Ala Ala Leu Arg Ile Gln Asn Met Val Ser Ser Gly Arg Arg			
	325	330	335
Trp Leu Arg Glu Gln Gln His Arg Arg Trp Arg Leu His Cys Leu Lys			
	340	345	350
Leu Gln Pro Leu Ser Pro Val Pro Ser Asp Ile Glu Ile Ser Arg Gly			
	355	360	365
Gln Thr Pro Lys Ala Val Asp Val Leu Ala Lys Glu Ile Gly Leu Leu			
	370	375	380
Ala Asp Glu Ile Glu Ile Tyr Gly Lys Ser Lys Ala Lys Val Arg Leu			
	385	390	395
Ser Val Leu Glu Arg Leu Lys Asp Gln Ala Asp Gly Lys Tyr Val Leu			
	405	410	415
Val Ala Gly Ile Thr Pro Thr Pro Leu Gly Glu Gly Lys Ser Thr Val			
	420	425	430
Thr Ile Gly Leu Val Gln Ala Leu Thr Ala His Leu Asn Val Asn Ser			
	435	440	445
Phe Ala Cys Leu Arg Gln Pro Ser Gln Gly Pro Thr Phe Gly Val Lys			
	450	455	460

Gly Gly Ala Ala Gly Gly Gly Tyr Ala Gln Val Ile Pro Met Glu Glu
465 470 475 480

Phe Asn Leu His Leu Thr Gly Asp Ile His Ala Ile Thr Ala Ala Asn
485 490 495

Asn Leu Leu Ala Ala Ala Ile Asp Thr Arg Ile Leu His Glu Asn Thr
500 505 510

Gln Thr Asp Lys Ala Leu Tyr Asn Arg Leu Val Pro Leu Val Asn Gly
515 520 525

Val Arg Glu Phe Ser Glu Ile Gln Leu Ala Arg Leu Lys Lys Leu Gly
530 535 540

Ile Asn Lys Thr Asp Pro Ser Thr Leu Thr Glu Glu Glu Val Ser Lys
545 550 555 560

Phe Ala Arg Leu Asp Ile Asp Pro Ser Thr Ile Thr Trp Gln Arg Val
565 570 575

Leu Asp Thr Asn Asp Arg Phe Leu Arg Lys Ile Thr Ile Gly Gln Gly
580 585 590

Asn Thr Glu Lys Gly His Tyr Arg Gln Ala Gln Phe Asp Ile Ala Val
595 600 605

Ala Ser Glu Ile Met Ala Val Leu Ala Leu Thr Asp Ser Leu Ala Asp
610 615 620

Met Lys Ala Arg Leu Gly Arg Met Val Val Ala Ser Asp Lys Ser Gly
625 630 635 640

Gln Pro Val Thr Ala Asp Asp Leu Gly Val Thr Gly Ala Leu Thr Val
645 650 655

Leu Met Lys Asp Ala Ile Lys Pro Asn Leu Met Gln Thr Leu Glu Gly
660 665 670

Thr Pro Val Phe Val His Ala Gly Pro Phe Ala Asn Ile Ala His Gly
675 680 685

Asn Ser Ser Val Leu Ala Asp Lys Ile Ala Leu Lys Leu Val Gly Glu
 690 695 700

Glu Gly Phe Val Val Thr Glu Ala Gly Phe Gly Ala Asp Ile Gly Met
 705 710 715 720

Glu Lys Phe Phe Asn Ile Lys Cys Arg Ala Ser Gly Leu Val Pro Asn
 725 730 735

Val Val Val Leu Val Ala Thr Val Arg Ala Leu Lys Met His Gly Gly
 740 745 750

Gly Pro Ser Val Thr Ala Gly Val Pro Leu Lys Lys Glu Tyr Thr Glu
 755 760 765

Glu Asn Ile Gln Leu Val Ala Asp Gly Cys Cys Asn Leu Gln Lys Gln
 770 775 780

Ile Gln Ile Thr Gln Leu Phe Gly Val Pro Val Val Val Ala Leu Asn
 785 790 795 800

Val Phe Lys Thr Asp Thr Arg Ala Glu Ile Asp Leu Val Cys Glu Leu
 805 810 815

Ala Lys Arg Ala Gly Ala Phe Asp Ala Val Pro Cys Tyr His Trp Ser
 820 825 830

Val Gly Gly Lys Gly Ser Val Asp Leu Ala Arg Ala Val Arg Glu Ala
 835 840 845

Ala Ser Lys Arg Ser Arg Phe Gln Phe Leu Tyr Asp Val Gln Val Pro
 850 855 860

Ile Val Asp Lys Ile Arg Thr Ile Ala Gln Ala Val Tyr Gly Ala Lys
 865 870 875 880

Asp Ile Glu Leu Ser Pro Glu Ala Gln Ala Lys Ile Asp Arg Tyr Thr
 885 890 895

Gln Gln Gly Phe Gly Asn Leu Pro Ile Cys Met Ala Lys Thr His Leu
 900 905 910

Ser Leu Ser His Gln Pro Asp Lys Lys Gly Val Pro Arg Asp Phe Ile
 915 920 925

Leu Pro Ile Ser Asp Val Arg Ala Ser Ile Gly Ala Gly Phe Ile Tyr
 930 935 940

Pro Leu Val Gly Thr Met Ser Thr Met Pro Gly Leu Pro Thr Arg Pro
 945 950 955 960

Cys Phe Tyr Asp Ile Asp Leu Asp Thr Glu Thr Glu Gln Val Lys Gly
 965 970 975

Leu Phe

<210> 3
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 cgggatccgc catgggcacg cgtctgccgc tcgtcctg 38

<210> 4
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 ccgctcgagg aacaagcctt taacttggtc tgtttcgg 38

<210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 gctttggtgc tgacatcgga atg 23

<210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 cccggacgtc actgataggt aag 23

<210> 7

<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Ser Ser Gly Gly Gly
1 5

出願人又は代理人の書類記号 P05024100	国際出願番号 PCT/JP2004/014812
----------------------------	-----------------------------

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
20	16
頁、 行	
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）	
寄託の日付 平成15年（2003）6月25日	受託番号 FERM BP-8419
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
ヨーロッパ特許条約施行規則28(3)の規定に基づき、 微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、 試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合） EP	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 半田 捷子

国際事務局記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 21 Oct. 2004
権限のある職員 藤野 かおり

出願人又は代理人の書類記号	P05024100	国際出願番号	PCT/JP2004/014812
---------------	-----------	--------	-------------------

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
20	16
頁、	行
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）	
日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）	
寄託の日付	平成15年（2003）6月25日
受託番号	FERM BP-8419
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
<p>オーストラリア特許法施行規則3.25の規定に基づき、 本願に関し、ブタペスト条約に従って寄託された物質の試料は、 本願の特許付与の前、又は本願の失効、取下げ若しくは拒絶の前にのみ、 本発明に利害関係の無い熟練した名宛人であり、試料の提供をオーストラリア特許庁長官に 要求した者によって任命された者に対してのみ行われるものとする。</p>	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）	
AU	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）	
下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員
半田 捷子

国際事務局記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日
21 OCT. 2004
権限のある職員
藤野 ちあき

出願人又は代理人の書類記号	P05024100	国際出願番号	PCT/JP 2004/014812
---------------	-----------	--------	--------------------

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
20	16
頁、	行
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)	
寄託の日付 平成15年(2003) 6月25日	受託番号 FERM BP-8419
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
カナダ特許法サブセクション104(4)及び 同特許法規則160(4)の規定に基づき、 微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、 試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）	
CA	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）	
下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 半田 捷子

様式PCT/RO/134 (1992年7月)

国際事務局記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 21 Oct. 2004
権限のある職員 藤野 かいり

書式 8 (第7条第1項関係)

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。

原寄託についての受託証

氏名 (名称) 第一製薬株式会社
代表取締役 森田 清 殿
寄託者 あて名 〒
東京都中央区日本橋三丁目14番10号

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) pCMV-T ₂ g4A-hC1S	(受託番号) FERM BP- 8419
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1株の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
<input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成15年 6月25日(原寄託日)に受領した1株の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日(原寄託日)に1株の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター International Patent Organism Depositary 名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology センター長 岡 修一 Dr. Syunichi Oka, Director あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第5 (郵便番号 305-8566) AIST Tsukuba Central 6.1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan	
平成15年(2003) 6月25日	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014812

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/00, A61K45/00, A61P1/00, A61P35/00, C07K16/40, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, C12N9/00, C12N9/06, C12N9/78, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00, A61K45/00, A61P1/00, A61P35/00, C07K16/40, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, C12N9/00, C12N9/06, C12N9/78, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/Geneseq, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 02/083873 A2 (Incyte Genomics Inc.), 24 October, 2002 (24.10.02), & AU 2002257273 A1 & AU 2002346382 A1	1-15 16-19
P, X	Prasannan, P. et al., Human mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase: gene structure, tissue distribution of the mRNA, and immuno localization in Chinese Hamster ovary cells. J.Biol.Chem., Vol.278(44), pages 43178 to 43187, (2003 August)	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 November, 2004 (16.11.04)

Date of mailing of the international search report
30 November, 2004 (30.11.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014812

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 20
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Although the "inhibitor" as set forth in claim 20 includes any substances inhibiting the function of the protein according to claims 10 and 11, no specific substance having this function is presented in the description. Therefore, the invention according to claim 20 using the same (continued to extra sheet)
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014812

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet (2)

is neither supported by the description nor disclosed therein. Moreover,
the above claim is described in an extremely unclear manner.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00, A61K45/00, A61P1/00, A61P35/00, C07K16/40, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, C12N9/00, C12N9/06, C12N9/78, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00, A61K45/00, A61P1/00, A61P35/00, C07K16/40, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, C12N9/00, C12N9/06, C12N9/78, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/Geneseq, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 02/083873 A2 (Incyte Genomics Inc) 2002.10.24 & AU 2002257273 A1 & AU 2002346382 A1	1-15 16-19
P X	Prasannan, P. et al., Human mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase: gene structure, tissue distribution of the mRNA, and immunolocalization in Chinese hamster ovary cells. J. Biol. Chem., Vol. 278(44) pp. 43178-43187 (2003 Aug)	1-15

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.11.2004

国際調査報告の発送日

30.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照

4 N

8 4 1 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☒ 請求の範囲 20 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲20に記載の「阻害剤」は、請求の範囲10、11の蛋白質の機能を阻害するあらゆる物質を包含するものであるが、明細書には、このような機能を有する物質が具体的に記載されていないから、それを利用する請求の範囲20の発明は明細書による裏付けを欠き、開示も欠き、かつ前記請求の範囲の記載は著しく不明瞭である。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。